



UNICAMP Universidade Estadual de Campinas

Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo

Processo oxidativo avançado UV/ H_2O_2 na oxidação da carbamazepina: avaliação por ensaios respirométricos e ecotoxicológicos

Armando Carvalho de Oliveira Martins

Campinas

2009



UNICAMP Universidade Estadual de Campinas

Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo

Armando Carvalho de Oliveira Martins

Processo oxidativo avançado UV/ H₂O₂ na oxidação da carbamazepina: avaliação por ensaios respirométricos e ecotoxicológicos

Dissertação de Mestrado apresentada à Comissão de Pós-graduação da Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo da Universidade de Campinas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil, na área de concentração de Saneamento e Ambiente.

Orientador: Alexandre Nunes Ponezi

Campinas

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

M366p Martins, Armando Carvalho de Oliveira
Processo oxidativo avançado UV/ H₂O₂ na oxidação da carbamazepina: avaliação por ensaios respirométricos e ecotoxicológicos / Armando Carvalho de Oliveira Martins. --Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Alexandre Nunes Ponezi.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo.

1. Carbamazepina. 2. Aguas residuais - Tratamento. 3. Biodegradação. I. Ponezi, Alexandre Nunes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo. III. Título.

Título em Inglês: Advanced oxidation process UV/ H₂O₂ in the oxidation of carbamazepina: assesment with respirometry and ecotoxicological assays

Palavras-chave em Inglês: Carbamazepine, Sewage treatment, Biodegradation
Área de concentração: Saneamento e Ambiente

Titulação: Mestre em Engenharia Civil

Banca examinadora: Suely Ivone Borrely, Eglé Novaes Teixeira

Data da defesa: 26/01/2009

Programa de Pós Graduação: Engenharia Civil

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL, ARQUITETURA E
URBANISMO.**

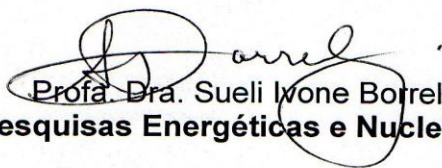
**Processo oxidativo avançado UV/ H₂O₂ na oxidação da carbamazepina:
avaliação por ensaios respirométricos e ecotoxicológicos**

Armando Carvalho de Oliveira Martins

**Dissertação de Mestrado aprovada pela Banca Examinadora, constituída
por:**



**Prof. Dr. (Alexandre Nunes Ponezi)
Presidente e Orientador(a)/Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e
Urbanismo FEC/UNICAMP.**



**Profa. Dra. Sueli Ivone Borrelly
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/USP).**



**Profa. Dra. Eglé Novaes Teixeira
Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo FEC/UNICAMP.**

Campinas, 26 de Janeiro de 2009.

EPIGRAFE

“Uma mente que se abre a uma nova idéia
nunca mais volta ao seu tamanho original”

Albert Einsten

DEDICATÓRIA

Ao meu pai e a minha mãe por sempre me
incentivarem em toda vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Roberto Guimarães por ter se interessado, disponibilizado o equipamento de POA empregado nesse estudo e ter corrigido partes do trabalho.

Ao Dr. Adílson Sartoratto por se apresentar sempre disponível para elucidar toda e qualquer dúvida na parte de análise tanto sobre cromatografia em camada delgada como cromatografia líquida de alta eficiência.

À Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder por ter me ajudado com o procedimento em cromatografia em camada delgada.

Agradeço ao meu orientador Dr. Alexandre Nunes Ponezi que se revelou uma pessoa extraordinária por se apresentar sempre disposto, presente, bem humorado, interessado e companheiro para todas as horas de que precisei dele.

Agradeço à Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte por sua ajuda e interesse, pois mesmo não participando do trabalho de maneira direta sempre se dispôs a me ajudar no que fosse necessário.

A Márcia Cristina Claudino, Éricka Leticia da Silva, Alessandra Cazellato, Camila Delarmelina, Márcio de Oliveira, Renata Duarte e Fabiano Salati, profissionais do laboratório de Microbiologia do CPQBA, pessoas estas que foram fundamentais para que esse trabalho fosse concluído, seja oferecendo ajuda, tirando dúvidas, me treinando ou simplesmente pelo companheirismo e pela manutenção do meu ambiente de trabalho sempre saudável.

Agradeço à Suzete Caminada por seu companheirismo, por ter me ensinado muito durante esta trajetória, por ter dado opiniões sempre muito pertinentes ao trabalho que estava sendo desenvolvido.

Devo minha gratidão também a Gabriel Fonseca Alegre e Antonio Carlos Nogueira Neto, do laboratório de ecotoxicologia do IPEN/USP, por toda a atenção dispendida durante as análises toxicológicas.

Agradeço também à Dra Sueli Ivone Borrely por disponibilizar o laboratório o qual é responsável e toda a atenção que me deu quando precisei.

A Enelton Fagnani e Ligia Maria Domingues por terem tido interesse neste trabalho, paciência em todas as vezes que precisei usar as dependências do Labsan e por sempre estarem disponíveis quando precisei deles.

RESUMO

Martins, Armando Carvalho de O. – **Avaliação do processo oxidativo avançado UV/H₂O₂ na degradação da carbamazepina, ensaios de degradabilidade e toxicologia.** Campinas: Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo – UNICAMP, 2009. 101 p. Dissertação (mestrado).

O efeito da poluição é resultado inerente da ocupação humana com grande impacto ao ambiente. Um problema atual é a contaminação dos corpos d'água com produtos de origem industrial, agrícola e produtos de origem farmacológica e de cuidado pessoal. Os fármacos são considerados contaminantes ambientais devido a estas moléculas serem biologicamente ativas. Neste trabalho foi estudada a biodegradabilidade direta da carbamazepina, sua degradação por processo oxidativo avançado e por processo oxidativo avançado seguido de respirometria. Foi utilizado como metodologia a cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência, análises toxicológicas, respirométricas, demanda química de oxigênio e carbono orgânico total. A avaliação do potencial de biodegradação direta da carbamazepina por microrganismos provenientes do lodo ativado e do solo não apresentaram resultados satisfatórios. A melhor concentração de carbamazepina a ser utilizada no processo oxidativo, foi de 10 ppm. As análises de carbono orgânico total, referente ao processo de oxidação em reator de ultravioleta com peróxido de hidrogênio, realizadas após o tratamento mostraram que a taxa de remoção de carbono da solução foi de 1%. A análise da demanda química de oxigênio, realizada a partir das amostras geradas do reator nos tempos de reação de 5, 15, 30, 45 e 60 minutos não apresentou qualquer mudança significativa. Os ensaios de respirometria (biodegradação) mostraram uma degradação de aproximadamente 1% do composto químico para todos os tratamentos com ultravioleta com peróxido de hidrogênio utilizados. Nos testes de biodegradabilidade os microrganismos não foram capazes de utilizar o fármaco como fonte de carbono e energia mesmo após o tratamento com ultravioleta com peróxido de hidrogênio. A avaliação do desenvolvimento dos microrganismos durante o ensaio de biodegradação apresenta decréscimo acentuado do número de microrganismos viáveis presentes tanto para o composto puro como também para os ensaios realizados após o tratamento com ultravioleta com peróxido de hidrogênio. Os subprodutos gerados no processo oxidativo avançado apresentam efeitos tóxicos agudos para a *Ceriodaphnia dubia* e *Vibrio fischeri* nos ensaios toxicológicos.

Palavras chave: Carbamazepina, processo oxidativo avançado, biodegradação, tratamento de efluentes e UV/H₂O₂

ABSTRACT

Martins, Armando Carvalho de O. - **Advanced oxidation process UV/H₂O₂ assesment in the degradation of carbamazepine, respirometry e toxicological assays** Campinas: Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo – UNICAMP, 2009. 101 p. Dissertação (mestrado).

Pollution is a direct result of human occupation. Since the big human conglomerates appeared became clear its harmfulness to the environment. Today there is a growing concern with water pollution by industrial, agricultural, pharmaceutical and personal care products. Pharmaceutical and personal care products contaminates the water in the domestic effluent, or in an inappropriate disposal of then in urban trash. The pharmaceutical products are considered environmental contaminants because their molecules are biologically actives. In this study the direct biodegradability of carbamazepine, its degradation by advanced oxidation process and advanced oxidation process followed by respirometry were evaluated. The total organic carbon, chemical oxygen demand, thin layer chromatography, high pressure liquid chromatography and respirometry were utilized to obtain the results of this work. The biodegradability results by microorganisms in soil and silt were not satisfying. An optimal concentration of 10ppm of carbamazepina was used in the advanced oxidation process. The total organic carbon results of the advanced oxidation process in UV/H₂O₂ reactor after the treatment revealed a removal rate of 1%. The respirometry assays showed less than 1% degradation of the chemical compound for all UV/H₂O₂ treatment. The results indicate that the microorganisms were not able to use the pharmaceutical product as a carbon and energy source even after UV/H₂O₂ treatment. The evaluation of microscopic development during the biodegradation assays revealed a drastic fall in the number of viable microorganisms presents in the pure compound as well as after the advanced oxidation process. The toxicological assays showed that the advanced oxidation process generated sub products and have acute toxicological effects for *Ceriodaphnia dubia* and *Vibrio fischeri*.

Key words: Carbamazepine, advanced oxidation processes, biodegradation, sewage treatment processes and UV/H₂O₂.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Rotas de produtos farmacêuticos humanos e veterinários ao ambiente. Fonte: Halling-Sorensen <i>et. al.</i> (1998), Adaptado por Ponezi, (2006)	24
Figura 2 Representação esquemática da molécula da carbamazepina. Fonte: Toxnet (2006) e (GOODMAN E GILMAN, 1990).....	32
Figura 3 Molécula de peróxido de hidrogênio.....	40
Figura 4 Etapas da degradação da carbamazepina por UV/H ₂ O ₂ Fonte: Vogna <i>et. al</i> (2004)	42
Figura 5- Organograma dos experimentos realizados	44
Figura 6 Reator de UV/ H ₂ O ₂ montado no suporte universal juntamente com agitador magnético.....	50
Figura 7 Partes que constituem o reator de cima para baixo são: bulbo da lâmpada de mercúrio, sistema de refrigeração com água corrente e recipiente de amostra.	51
Figura 8 - Esquema de placa de CCD com seus pontos de aplicação.....	53
Figura 9 Processo de Cromatografia em Camada Delgada	54
Figura 10 Foto da <i>Ceriodaphnia dubia</i> – organismo-teste empregado na avaliação de efeito da droga a organismos aquáticos	61
Figura 11 Montagem do ensaio de toxicidade aguda.Cada copo representa uma réplica	65
Figura 12 Analisador de Toxicidade por fotoluminescência bacteriana - Modelo M 500 Microbics.	66
Figura 13 – Análise por CCD da Carbamazepina (CBZ) em concentração de 10 e 15 ppm após período de reação de 5 minutos em reator UV/H ₂ O ₂ com adição de H ₂ O ₂ nas concentrações de 16 e 26ppm	74

Figura 14 - Análise por CCD da Carbamazepina (CBZ) em concentração de 10 e 15 ppm após período de reação de 15 minutos em reator UV/H ₂ O ₂ com adição de H ₂ O ₂ nas concentrações de 16 e 26ppm	75
Figura 15 - Análise por CCD da Carbamazepina (CBZ) em concentração de 10 e 15 ppm após período de reação de 30 minutos em reator UV/H ₂ O ₂ com adição de H ₂ O ₂ nas concentrações de 16 e 26ppm	75
Figura 16 - Análise por CCD da Carbamazepina (CBZ) em concentração de 10 e 15 ppm após período de reação de 45 minutos em reator UV/H ₂ O ₂ com adição de H ₂ O ₂ nas concentrações de 16 e 26ppm	76
Figura 17 - Análise por CCD da Carbamazepina (CBZ) em concentração de 10 e 15 ppm após período de reação de 60 minutos em reator UV/H ₂ O ₂ com adição de H ₂ O ₂ nas concentrações de 16 e 26ppm	76
Figura 18 Análise de COT da oxidação da carbamazepina após os períodos de reação em reator UV/H ₂ O ₂ . Concentração inicial de 10 ppm. Período de reação de 0 a 60 minutos.....	78
Figura 19 Análise de DQO da carbamazepina após os períodos de reação em reator UV/H ₂ O ₂ . Concentração inicial de 10 ppm. Período de reação de 5 a 60 minutos	79
Figura 20 - Efeito do tratamento UV/H ₂ O ₂ sobre a carbamazepina durante o período de reação de 5 a 60 minutos. Concentração inicial 10 ppm. Análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	80
Figura 21 - Perfil de degradação da carbamazepina após ensaio de respirometria analisados por CLAE, T5 a T60 indica o tempo de detenção dentro do reator.	81
Figura 22 DQO do ensaio de respirometria feito a partir das amostras geradas no POA.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Efeitos tóxicos de fármacos em organismos aquáticos.....	26
Tabela 2 Concentração de alguns produtos farmacêuticos em água de abastecimento	29
Tabela 3 Métodos utilizados na determinação de fármacos em ambientes aquáticos: Método e Substâncias Referência.....	30
Tabela 4 Consumo anual de diferentes classes de fármacos em diferentes países da UE. (t/ano).....	31
Tabela 5 Propriedades físico-químicas da Carbamazepina.....	33
Tabela 6 Eficiência de remoção afluente e efluente de fármacos em plantas de tratamento de esgotos.	36
Tabela 7 Processos oxidativos avançados:.....	39
Tabela 8 Potencial de oxidação de alguns oxidantes na água	40
Tabela 9 Meio Sintético.	48
Tabela 10 Conteúdos para preparo da solução nutriente (cfe.descrito no item 4.4 do método E.1.1.3 - IBAMA).....	56
Tabela 11 Ensaio de toxicidade utilizando a carbamazepina.....	61
Tabela 12 Condições teste – Toxicidade aguda <i>Ceriodaphnia dubia</i>	62
Tabela 13 Avaliação do potencial de biodegradação direta da carbamazepina por microrganismos provenientes do lodo ativado.	71
Tabela 14 Avaliação do potencial de biodegradação direta da carbamazepina por microrganismos provenientes do solo.....	72
Tabela 15 Contagem de microrganismos em UFC/mL dos ensaios de biodegradabilidade. Período de 27 dias. Tempo de reação em reator UV/H ₂ O ₂ de 5 a 60 minutos. Carbamazepina/ H ₂ O ₂ 10/26 ppm respectivamente. Branco composto puro. ...	83

Tabela 16 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Vibrio fischeri</i> realizado após oxidação da carbamazepina por processo UV/H ₂ O ₂ seguido por respirometria	87
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

POA- processo oxidativo avançado
CCD- Cromatografia em camada delgada
CLAE- cromatografia líquida de alta eficiência
DQO- demanda química de oxigênio
COT- carbono orgânico total
CENO- concentração de efeito não observado
DL- dose letal
MIC- Concentração inibitória mínima
EC- Concentração efetiva
ETE- estação de tratamento de esgoto
ETA- estação de tratamento de água
CG/EM- Cromatografia gasosa acoplado a espectrofotometria de massas
CG-EM/EM- Cromatografia gasosa acoplado a espectrofotometria de massas em série
CLAE/EM/EM- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrofotometria de massas em série
CLAE/EM- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrofotometria de massas
 K_{ow} – Coeficiente octanol/ água
CTT- Cloreto de trifenil tetrazólio
PCA- Agar plate contage
QSARs- Quantitative Strtucture - Activiti Relationships
DL₅₀ - Dose letal para 50% dos animais teste
CENO- Concetração Efetiva Não Observada
MS – Meio Sintético
CTT – Cloreto de Trifenil Tetrazólio
TLC – Thin Layer Cromatography
 R_f - Fator de retenção
ETE – Estação de Tratamento de Esgoto
rpm – Rotação por minuto
UFC- Unidade Formadora de Colônias
HPLC- High Presured Liquid Cromatography
POA- Processo Oxidativo Avançado
FBC- Fator de Bioacumulação Calculado
CBZ- Carbamazepina

SUMÁRIO

1 Introdução	19
2 Objetivos	21
2.1 Objetivos Gerais	21
2.1.1 Objetivos específicos.....	21
3 Revisão Bibliográfica	23
3.1 Fármacos residuais no ambiente	23
3.2 Impactos na saúde humana	26
3.3 Métodos analíticos utilizados na determinação de fármacos	29
3.4 A Carbamazepina.....	31
<i>Neuroativos</i>	31
3.4.1 Carbamazepina nos sistemas de tratamento atuais.....	35
3.4.2 Impactos da Carbamazepina.....	35
3.4.3 Normas nacionais.....	38
3.5 Processo Oxidativo Avançado (POA)	38
4.1 O Processo Oxidativo Avançado UV/H ₂ O ₂	39
3.7 Aplicações e suas características.....	41
Materiais e Métodos	44
4.1 Proposta Metodológica.....	44
4.2 Locais de realização dos experimentos.....	45
4.3 Fonte	46
4.3.1 Químicos	46
4.4 Avaliação da Carbamazepina CAS 298-46-4 - pelo modelo de relação quantitativa entre estrutura e atividade QSARs	46

4.5 Avaliação do potencial de biodegradação direta da carbamazepina por microrganismos do lodo ativado e do solo	47
4.5.1 Enriquecimento das amostras	47
4.5.2 Identificação de colônias bacterianas metabolicamente ativas	48
4.6 Oxidação em reator de UV/H ₂ O ₂	49
4.6.1. Montagem do equipamento	50
4.6.2. Operação do reator	51
4.8 Teste da biodegradabilidade imediata em sistema fechado, baseado no Teste de Gledhill-modificado, (IBAMA, 1988)	54
4.8.1 Preparação do inóculo.....	55
4.9 Avaliação do desenvolvimento dos microrganismos durante os ensaios de respirometria por plaqueamento.....	58
4.10 Análise da biodegradação da carbamazepina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	58
4.11 Avaliação da concentração de compostos de carbono através de análise quantitativa DQO (Demanda Química de Oxigênio) dos ensaios de respirometria e POA.	59
4.12 Análise do Carbono Orgânico Total (COT) das amostras do processo oxidativo...60	
4.13 Testes de toxicidade.....	60
4.13.1 Ensaios de Toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia spp</i> (Crustácea, Cladocera) método ABNT NBR 13373	61
4.13.1.1 Ensaio 1 Análise da toxicidade da solução de trabalho de carbamazepina	63
4.13.1.2 Ensaio 2 Análise da toxicidade do H ₂ O ₂ residual	63
4.13.1.3 Ensaio 3 Análise da toxicidade das amostras geradas na respirometria feita após tratamento UV/H ₂ O ₂	64
4.13.2 Ensaio de Toxicidade aguda com <i>Vibrio fischeri</i> método ABNT NBR 15411	65
4.13.2.1 Ensaio 1 Análise da toxicidade da solução de trabalho de carbamazepina	66
4.13.2.2 Ensaio 2 Análise das amostras nos diferentes tempos de detenção.....	67
4.13.2.3 Ensaio 3 Análise de toxicidade das amostras geradas na respirometria feita após tratamento UV/H ₂ O ₂	67
4.14 Descarte do material utilizado durante a realização da pesquisa.....	67

4.14.1 Material biológico.....	68
4.14.2 Material químico	68
5 Resultados	69
5.1 Avaliação da Carbamazepina CAS 298-46-4 - através do modelo de relação quantitativa entre estrutura e atividade QSARs.....	69
5.2 Avaliação do potencial de biodegradação direta da carbamazepina por microrganismos do lodo ativado e solo	71
5.3 Avaliação do processo oxidativo UV/H ₂ O ₂ da carbamazepina por CCD em diferentes períodos de reação	73
5.4 Análise do carbono orgânico total das amostras após tratamento do POA.....	78
5.5 Análise de DQO das amostras após tratamento do POA.....	79
5.6 A avaliação do efeito do tratamento UV/H ₂ O ₂ sobre a carbamazepina por CLAE ...	80
5.7 Avaliação da biodegradabilidade da carbamazepina em sistema fechado, baseado no Teste de Gledhill-modificado, (IBAMA, 1988), analisado por CLAE	81
5.8 Avaliação do desenvolvimento dos microrganismos durante os ensaios de respirometria por plaqueamento.....	82
5.9 Avaliação de DQO após ensaio de biodegradabilidade da carbamazepina em sistema fechado, baseado no Teste de Gledhill-modificado, 1988 (IBAMA).....	83
5.10 Toxicidade	84
5.10.1 Ensaios de Toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia dubia</i> (Crustacea, Cladocera), método ABNT NBR 13373	84
5.10.1.1 Ensaio 1 Análise da toxicidade da solução de trabalho de carbamazepina	85
5.10.1.2. Ensaio 2 Análise da toxicidade do H ₂ O ₂ residual das amostras	85
5.10.1.3 Ensaio 3 Análise da toxicidade das amostras geradas na respirometria feita após tratamento UV/H ₂ O ₂	85
5.10.2 Ensaios de Toxicidade aguda com <i>Vibrio fischeri</i> método ABNT NBR 15411	86
5.10.2.1 Ensaio 1 Análise da toxicidade da solução de trabalho de carbamazepina	86
5.10.2.2 Ensaio 2 Análise da toxicidade das amostras provenientes do reator UV/H ₂ O ₂ nos diferentes tempos de detenção	86
5.10.2.3 Ensaio 3 Análise de toxicidade das amostras geradas na respirometria feita após tratamento UV/H ₂ O ₂	87

6. Discussão	88
7. CONCLUSÃO.....	90
8. REFERÊNCIAS.....	93

1 Introdução

O efeito da poluição é resultado inerente da ocupação humana e desde o aparecimento de grandes conglomerados tem-se mostrado como uma mazela de grandes proporções para o ambiente natural. Um grande problema atual é a contaminação dos corpos d'água com produtos de origem industrial, agrícola e produtos de origem farmacológica e de cuidado pessoal. O grande desafio hoje para as estações de tratamento de água (abastecimento e residuária) vem do monitoramento da presença destas substâncias em concentrações reduzidas na faixa de micro grama e nano grama por litro. Sendo que, hoje inexistem alternativas para a eliminação destes compostos nas atuais estações de tratamento, e uma atual preocupação advém da necessidade de reciclagem da água para o abastecimento básico da população em grandes centros urbanos como, por exemplo, o Estado de São Paulo.

Destaque pode ser dado para o grupo de produtos farmacológicos e de uso pessoal, onde centenas de novas substâncias são lançadas a cada ano no ambiente aquático na forma de efluente doméstico, ou disposições indevidas destes produtos juntamente com o lixo doméstico. Os fármacos são considerados contaminantes ambientais devido a estas moléculas serem biologicamente ativas. Além disso, devido a grande maioria dos fármacos possuí características lipofílicas e freqüentemente apresentam baixa biodegradabilidade no ambiente. Estas propriedades intrínsecas apresentam um grande potencial para bioacumulação e persistência. No mundo todo tem sido reportado a ocorrência de fármacos como antibióticos, hormônios, anestésicos, antilipêmicos, depressivos, antiinflamatórios dentre outros, em esgotos

domésticos, em águas superficiais e sedimentos. A grande preocupação da presença destes fármacos residuais na água são os potenciais efeitos adversos para a saúde humana, animal e de organismos aquáticos, como os peixes. Estudos ecotoxicológicos feitos por *Fent et. al.* (2006) demonstram que estes efeitos podem ser detectados em qualquer nível da hierarquia biológica: célula, órgãos, organismos, populações e ecossistemas.

Nesse estudo dar-se-á ênfase a carbamazepina, composto utilizado no tratamento da epilepsia, depressão e também neuralgias do nervo trigêmeo. Este fármaco após ingestão é predominantemente metabolizado no fígado em 10,11 – epoxi carbamazepina e outros derivados e eliminados através de urina e fezes. Uma vez no ambiente, esta molécula apresenta uma meia vida de aproximadamente 80 dias (VOGNA *et. al.* 2004), com baixa ou nenhuma remoção nos atuais sistemas de tratamento. Essas características qualificam a carbamazepina como um fator de risco potencial tanto para a saúde humana como para animais de vida aquática. No presente trabalho visa-se a estudar o processo de biodegradação da Carbamazepina, por meio de ensaios respirométricos e avaliar o efeito toxicológico crônico desta substância em organismos testes.

2 Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar o processo oxidativo avançado (UV/H₂O₂) na oxidação da carbamazepina e estudar sua biodegradabilidade por método respirométrico e ensaios toxicológicos.

2.1.1 Objetivos específicos

- Averiguar as principais características do composto estudado;
- Realizar ensaios de biodegradabilidade da carbamazepina composto puro e oriundo do POA por método respirométrico e acompanhamento dos microrganismos por plaqueamento (pour plate);
- Avaliar o processo de oxidação (POA) da carbamazepina por cromatografia de camada delgada (CCD), demanda química de oxigênio (DQO) e carbono orgânico total (COT)
- Avaliar o processo de biodegradação da carbamazepina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);

- Analisar por ensaios toxicológicos a partir dos ensaios respirométricos, antes após o processo oxidativo avançado UV/H₂O₂, a toxicidade das amostras geradas.

3 Revisão Bibliográfica

Neste capítulo teve-se como objetivo descrever de forma sucinta a ocorrência de fármacos no ambiente, mais especificamente a carbamazepina, quais os impactos mais significativos e como os tratamentos tradicionais colaboram para sua remoção.

3.1 Fármacos residuais no ambiente

Fármacos são micropoluentes que têm hoje presença constante em matrizes ambientais, como solo e água. Se somadas a quantidade das variedades de drogas de uso na saúde humana, animal e produtos para o cuidado pessoal existentes, torna-se evidente a sua perene deposição ambiental. Ciências como farmacodinâmica e farmacocinética associadas à ecotoxicologia apresentam resultados preocupantes do risco potencial dos fármacos e suas formulações e dissociações aos sistemas ambientais (SANDERSON *et al.*, 2004).

As rotas de exposição de produtos farmacêuticos no ambiente são diferentes quando comparados os produtos de uso veterinário aos de uso humano (Figura 1). A extensão dos impactos também aparece de maneira diferenciada entre os dois casos. No entanto o final apresenta o mesmo caminho, o ambiente aquático.

Essa contaminação é carregada por corpos d'água, impactando águas superficiais, subterrâneas e o solo. O impacto gerado de cada tipo de produto farmacêutico tem características próprias normalmente ligadas ao seu princípio ativo, função para que são desenvolvidos, como também por suas características químicas.

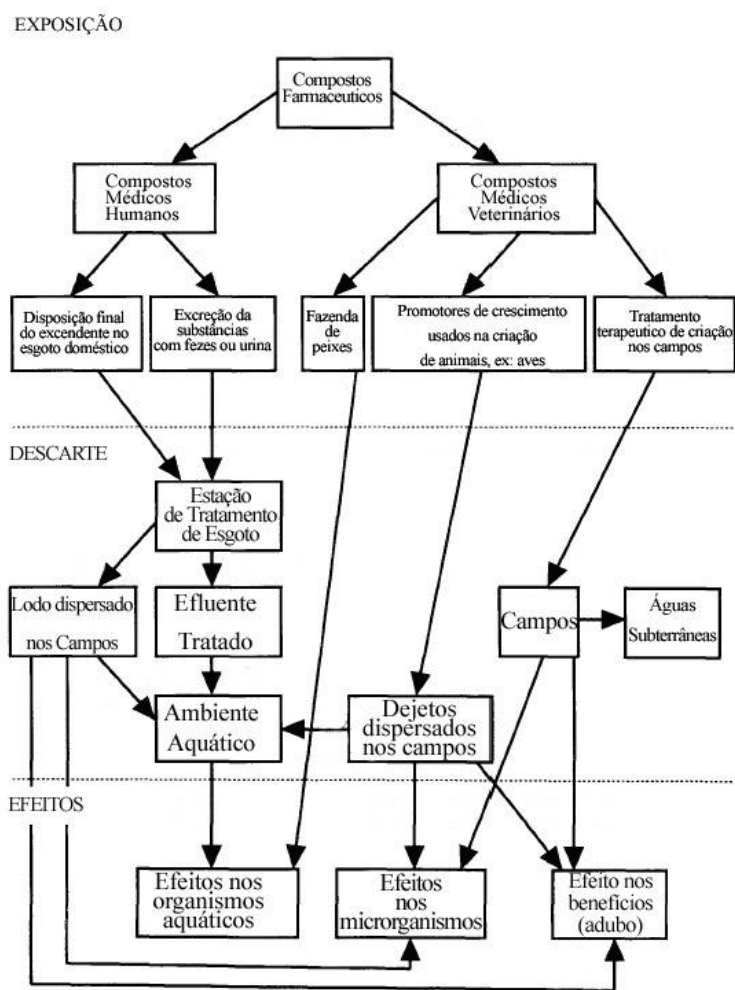


Figura 1 Rotas de produtos farmacêuticos humanos e veterinários ao ambiente. Fonte: Halling-Sorensen *et. al.* (1998), Adaptado por Ponezi, (2006)

Alguns produtos farmacêuticos são projetados para atingir órgãos ou rotas metabólicas e moleculares específicas, tanto nos humanos como em animais, o que lhes conferem freqüentemente também efeitos colaterais importantes. Quando introduzidos no ambiente, esses produtos, veterinários ou humanos, podem afetar os animais pelas mesmas rotas e atingir órgãos, tecidos, células ou biomoléculas com funções semelhantes a dos humanos (FENT *et al.* 2006).

É importante reconhecer que para muitos produtos farmacêuticos desenvolvidos para uso humano, o efeito específico ou o modo de ação não são muito bem conhecidos e que para outros organismos, não humanos, podem agir de modo diferente e adverso. Os ensaios ecotoxicológicos realizados hoje em dia foram desenvolvidos com sistema teste estabelecido com microrganismos tradicionais que objetivam a determinação da mortalidade. Entretanto estes testes deveriam ser realizados objetivando o efeito do fármaco em organismos vertebrados e invertebrados baseados na hipótese de semelhança no modo de ação (FENT *et al.*, 2006), que poderia ajudar na formação de conceitos para comparação destes testes com possíveis impactos para o ser humano.

A grande maioria dos fármacos é excretada através das fezes e urina como uma mistura de metabólitos e compostos não transformados (JONES *et. al.*, 2001; SANDERSON *et. al.* 2004). Um grande problema encontrado é a taxa de reposição continuada desses compostos, os quais potencialmente sustentam a exposição crônica nos organismos aquáticos (DAUGHTON e TERNES, 1999; SANDERSON *et al.* 2004). O efeito da toxicidade de algumas dessas substâncias pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 Efeitos tóxicos de fármacos em organismos aquáticos.

Composto	Uso terapêutico	Organismo teste	Toxicidade	Ensaio	Referência
Clorofibrato	Antilipêmico	Alga	EC10 = 5,4 mg/L EC50 = 12 mg/L	Inibidor de crescimento	Kopf (1995)
Diazepan	Psicofarmaco	<i>D. magna</i>	DL50 = 13,9 mg/L DL50 = 4,3 mg/L	Reprodução	Lilius <i>et al.</i> (1995) Calleja <i>et. al.</i> (1993)
Etinilestradiol	Hormônio	Alga	EC10 = 0,054 mg/L EC50 = 0,84 mg/L	Reprodução	Kopf (1995)
Ibuprofen	Analgésico	<i>Trichphyton rubrum</i>	MIC = 5- 10 g/ml	MIC pH 5	Sanyal <i>et al.</i> (1993)
Metronidazol	Antibiótico	<i>Chlorella sp.</i>	EC10 = 2,03 mg/L (72 horas)	Resistência	Leff <i>et al.</i> (1993)
Ivermectin	Vermífogo	<i>D. magna</i>	DL50 = 0,025 ppb CENO = 0,01 ppb (48 horas)	Reprodução	Halley <i>et al.</i> (1989)
Estrogênio	hormônio	Alfafa	0,02-2nmol/L 200-2000nmol/L.	Crescimento	Shore <i>et al.</i> (1992)

Fonte: Halling-Sorensen (1998).

3.2 Impactos na saúde humana

Devido à presença de resíduo de fármacos na água potável, o efeito dos fármacos na saúde humana deve ser analisado de maneira ordenada e qualitativa, levando em consideração as preocupações especiais e as necessidades da sociedade.

Clássico exemplo é o uso de antibióticos, grande preocupação dos especialistas, devido a estes ocasionarem o desenvolvimento de resistência em populações bacterianas. O aumento do uso e de tipos de antibióticos durante as últimas cinco décadas resultou em uma seleção genética de bactérias resistentes, com efeito, em longo prazo e provavelmente irreversível (SANDERSON *et. al.*, 2004). Jorgensen e Halling-Sorensen, (1998), comentam em seus estudos que o desenvolvimento de resistência é favorecido através da exposição a baixas concentrações deste composto.

Outro exemplo que requer preocupação especial são os hormônios sexuais que podem atuar como disruptores endócrinos em organismos não-alvo a baixas

concentrações. Também requerem atenção especial os antineoplásicos e imunossupressores que são utilizados em quimioterapia, os quais são conhecidos como potentes agentes mutagênicos. Alguns aditivos utilizados em medicamentos como parafinas, corantes, estabilizadores, e surfactantes são reportados na literatura como produtos extremamente tóxicos ($EC_{50} < 0.1 \text{ mg/L}^{-1}$), assim, produtos formulados deveriam reduzir o uso destes aditivos sem comprometer a eficácia do produto (SANDERSON *et al.*, 2004).

Fármacos menos específicos que atingem mecanismos básicos de funções celulares podem ter seu efeito tóxico aumentado devido a estas substâncias atingirem organismos não-alvos pelos mesmos mecanismos basais (SEILER *et al.*, 1999).

Novos fármacos possuem especificidades maiores ao receptor alvo sendo maiores as chances de prever o potencial de efeitos aos organismos não alvos e seus modos estreitos de ação (DAUGHTON, 2003).

Os impactos de substâncias químicas incluindo os fármacos podem ser detectados qualquer nível da hierarquia biológica; células, organismos, populações e ecossistemas. Efeitos sutis podem ser seleção genética, rompimento endócrino, genotoxicidade e subseqüentemente alterar o comportamento metabólico e funções da espécie no ecossistema (JORGENSEN e HALLING-SORENSEN, 2000).

Como os indivíduos e ecossistemas são caracterizados através da história genética, eco-organização, sucessão e evolução, podem ser parâmetros de difícil análise destas mudanças sutis em ecossistemas devido ao complicado inter-relacionamento dos mesmos (SANDERSON *et al.*, 2004).

A presente habilidade para distinguir normal/saudável de anormal/doente em sistemas complexos, é muito relativa, devido à falta de sistemas comparativos e de como estes são afetados. Por exemplo, misturas de fármacos com agrotóxicos podem obscurecer a elucidação de efeitos sutis no ambiente. O poder de recuperação de um

ecossistema pode devolver a este um estado fixo dinâmico (regime) depois de uma perturbação, mas o estado para o qual este é revertido pode ser diferente, se uma mudança descontínua é efetuada (DAUGHTON, 2003).

Sinais biológicos sutis e/ou efeito cascata dos fármacos (concentrações extremamente baixas) no ambiente podem ser estudados em experiências de microcosmo (JORGENSEN e HALLING-SORENSEN, 2000; SANDERSON *et al.*, 2003; CLASSIC, 2002). Porém, na análise estatística e interpretação dos resultados deve-se informar a precisão do teste, e também o tempo de recuperação do ambiente. Recuperação neste contexto significa retorno a um estado natural não perturbado (SANDERSON, 2003).

WEBB *et. al.* (2003) relatam que a persistência destas substâncias representa um fator de risco potencial nas reservas de água de consumo humano. Apesar de os autores comentarem uma preocupação potencial do risco de contaminação com as reservas de água de sua origem, esta se torna verdadeira no Brasil onde atualmente nos grandes centros urbanos a prática de reuso de água é fato consumado. Um maior agravante é que em muitos casos há ausência de estações de tratamento de efluentes em uma grande maioria de municípios. Na Tabela 2 apresenta-se a concentração de alguns fármacos detectados em águas de abastecimento de diversos países.

Como pode ser observado na Tabela 2, existe uma grande variedade de compostos farmacêuticos em diferentes concentrações presentes em águas de abastecimento o que potencializa os possíveis efeitos na saúde humana e de animais aquáticos. Um outro problema encontrado foi a interação entre estes compostos dificultando ainda mais possíveis soluções desse problema (DOWNEY *et. al.* 2001).

Tabela 2 Concentração de alguns produtos farmacêuticos em água de abastecimento

Produto farmacêutico	País	Concentração máxima detectada (ng/L)
Bezafibrato	Alemanha	27
Bleomicina	Inglaterra	13
Ácido Clofíbrico	Alemanha	70
Ácido Clofíbrico	Alemanha	165
Ácido Clofíbrico	Alemanha	270
Ácido Clofíbrico	Alemanha	170
Ácido Clofíbrico	Itália	5,3
Carbamazepina	Canadá	24
Carbamazepina	EUA	258
Diazepam	Inglaterra	10
Diazepam	Itália	23,5
Diclofenac	Alemanha	6
Gemfibrozil	Canadá	70
Ibuprofen	Alemanha	3
Fenazone	Alemanha	250
Fenazone	Alemanha	400
Propifenazone	Alemanha	80
Propifenazone	Alemanha	120
Tilosina	Itália	1,7

Fonte: Jones *et. al.* (2002)

3.3 Métodos analíticos utilizados na determinação de fármacos

Para a determinação de fármacos, diferentes métodos analíticos são reportados na literatura, os quais são principalmente válidos para matrizes biológicas como sangue,

tecido e urina, sendo que algumas modificações nestes métodos podem ser suficientes para análises de amostras ambientais (BILA e DEZOTTI, 2003).

No entanto, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos mais sensíveis para a detecção de concentrações na faixa de $\mu\text{g/L}$ e ng/L para a análise destes compostos residuais, em efluentes de ETE, ETA, em águas de rios, de solos e água potável.

Em seu estudo, Ternes (2001) fez uma revisão de vários métodos analíticos utilizados na determinação de fármacos residuais, em diferentes matrizes aquosas Tabela 3.

Tabela 3 Métodos utilizados na determinação de fármacos em ambientes aquáticos: Método e Substâncias Referência

Método	Referência
CLAE/EM	Ácido salicílico, antiinflamatórios e antilipêmicos Ácido clofibrato, antibióticos, antilipêmicos, antiinflamatórios, anticonvulsivantes Antibióticos
CLAE/EM/EM	Antibióticos Analgésicos, β -bloqueadores, antilipêmicos, antibióticos Antiinflamatórios, drogas psiquiátricas e antidiabéticas β -bloqueadores, antibióticos Antibióticos
CG/EM	Analgésicos, antilipêmicos e metabólitos, antiinflamatórios. Analgésicos, antipiréticos, antiinflamatórios, antilipêmicos, anticonvulsivantes drogas psiquiátricas Estrogênios Ácido Clofibrato, antiinflamatórios, anticonvulsivantes
CG-EM/EM	Antiinflamatórios, anticonvulsivantes, ácido salicílico, ácido clofibrato, antilipêmicos. β -bloqueadores, drogas psiquiátricas, estrogênios Estrogênio

Fonte: TERNES, 2001

3.4 A Carbamazepina

Desenvolvida na década de 60, a carbamazepina ($C_{15}H_{12}N_2O$) atualmente é um dos antiepiléticos mais empregados em tratamentos em todo mundo, dada sua confiabilidade e previsibilidade, embora ainda não se saibam os mecanismos de ação dessa droga (GOODMAN e GILMAN, 1990). Na Tabela 4 pode se observar o consumo em alguns países europeus.

Tabela 4 Consumo anual de diferentes classes de fármacos em diferentes países da UE. (t/ano)

Composto	Alemanha (2001)	Áustria (1997)	Dinamarca (1997)	Austrália (1998)	Inglaterra (2000)	Itália (2001)	Suíça (2004)
Analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios							
AAS	836.26	78.45	0.21	20.4	-	-	43.80
As	71.67	9.57	-	-	-	-	5.30
Paracetamol	621.65	35.08	0.24	295.9	390.9		95.20
Naproxen	-	4.63	-	22.8	35.07	-	1.70
Ibuprofen	344.89	6.7	0.03	14.2	162.2	1.9	25.00
Diclofenaco	85.80	6.14	-	-	26.12	-	4.50
β - bloqueadores							
Atenolol	-	-	-	-	28.98	22.07	3.20
Metroprolol	92.97	2.44	-	-	-	-	3.20
Antilipêmicos							
Genfibrazol	-	-	-	20	-	-	0.399
Benzafibrato	-	4.47	-	-	-	7.60	0.757
<i>Neuroativos</i>							
Carbamazepina	87.60	6.33	-	9.97	40.35	-	4.40
Diazepam	-	-	-	0.21	-	-	0.051

Datas: representam o ano de amostragem. Fonte: FENT *et al.*, (2006)

A carbamazepina é comercializada no Brasil por vários fabricantes (Abbott, Biosintética, SEM, Eurofarma, Germed- Sigma pharm, Medley, Neoquímica, Teuto, União química, Sanval, Cristália, Cazi e Novartis), no entanto a formulação comercial mais conhecida é o Tegreto[®] (Novartis). A carbamazepina é vendida em farmácias

e/ou drogarias em cápsulas ou em suspensão, contendo de 20 a 30 comprimidos variando de 200 a 400mg e suspensão de 25 ppm respectivamente (CONSULTAREMEDIOS, 2008).

Este produto é um antiepilético, do grupo dos Iminostilbenos, usado no tratamento de convulsões, como também é usada sozinha ou combinada com sais de lítio no caso de depressão do transtorno bipolar e neuralgia do trigêmio, (CARUSO *et al.* 2002; VAN ROOYEN *et. al.* 2002; CLARA *et al.* 2004). A carbamazepina apresenta estrutura química similar a dos antidepressivos tricíclicos, como por exemplo, a imipramina, nortriptilina, protilina dentre outros (GOODMAN e GILMAN, 1990; KUBOVA e MARES, 1993). A representação esquemática da molécula da carbamazepina pode ser visualizada na Figura 2.



Figura 2 Representação esquemática da molécula da carbamazepina. Fonte: Toxnet (2006) e (GOODMAN E GILMAN, 1990).

A carbamazepina possui tempo de meia vida no organismo humano variável, dependendo da dose e frequência utilizada, decrescendo a absorção de 50 horas/200 mg para 28 horas quando utilizada terapia de 900 mg. Com o tempo, o fígado acaba por metabolizar a droga mais rapidamente o que leva ao aumento da dose terapêutica. Esse órgão transforma a carbamazepina predominantemente em 10-11 epoxi carbamazepina (GOODMAN E GILMAN, 1990).

Esse efeito descrito acima ocorre durante longas terapias. Quando sua meia vida no plasma sanguíneo é de 10 a 20 horas, ocasionada pela indução da síntese de enzimas, esse tempo pode ser mais longo em indivíduos que tomam uma única dose (GOODMAN E GILMAN, 1990). As principais propriedades físico-químicas da carbamazepina podem ser consultadas na Tabela 5 .

Tabela 5 Propriedades físico-químicas da Carbamazepina

Propriedades físico-químicas	Valor	Unidade	Temp (°C)	Fonte
Ponto de fusão	190,2	°C	-	
log P (octanol-água)	2,45	-	-	DAL POZZO,A <i>et al.</i> (1989)
Solubilidade em água	17,7	mg/L	25	MEYLAN,W.M. <i>et al.</i> (1996)
Pressão de Vapor	1,84E-07	mmHg	25	NEELY,W.B. & BLAU,G.E. (1985)
Constante de Henry	1,08E-10	Atm-m ³ /mole	25	MEYLAN,W.M. & HOWARD,P.H. (1991)
Constante de frequencia atmosfera OH	8,07E-11	cm ³ /moléculas/s	25	MEYLAN,W.M. & HOWARD,P.H. (1993)

Fonte: Toxnet (2006).

As concentrações terapêuticas registradas são de 6 a 8 µg/ml, contudo com variações consideráveis. Efeitos colaterais relacionados ao sistema nervoso central são freqüentes em concentrações de 8,5 a 10µg/ml (GOODMAN e GILMAN ., 1990).

De acordo com a bula do medicamento, a carbamazepina possui alguns efeitos indesejados como: diploidia, visão turva, sonolência, tonteira, náuseas, vômitos e

ataxia. Efeitos colaterais mais severos também foram relatados como morte por anemia aplástica e maelas cardiovasculares originadas por esse sal.

Foi constatada a ocorrência de anomalias cognitivas, hepáticas no sistema cardiovascular, urinário e neuronal, em filhos de mães que faziam tratamento monoterápico com carbamazepina (MERLOB, 2002). O tempo de gestação é normalmente encurtado também (MATALON *et. al.* 2002). A concentração de carbamazepina no leite materno corresponde de 30 a 80% quando comparada a do plasma sanguíneo (MEYER *et. al.* 1988), visto que pode se acumular no tecido (QSARs).

As interações com outros produtos farmacológicos se mostraram perigosas. Downey *et. al.* (2001) descobriram uma interação perigosa da carbamazepina com drogas para hipertensão, no caso em questão o antiepilético (carbamazepina) suprimia a ação do antihipertensivo.

Em estudos toxicológicos da carbamazepina mostraram que este composto é considerado carcinogênico em ratos, mas não apresenta atividade mutagênica em células de mamíferos (FENT *et. al.* 2006).

Efeitos subletais ocorrem em *Daphnia magna* com uma concentração de 92.000 ppm e letal no *Danio rerio* com 43.000 ppm (THAKER, 2005 e FENT *et al.* 2006). Segundo Budavari (1996) a DL 50 (dose letal de 50% para roedores) é de 670 mg/kg.

Testes de toxicidade da carbamazepina denunciaram toxicidade crônica em *C. dubia* [CENO (7 dias) = 25g/L, no rotífero *B. calyciflorus* [CENO (2 dias) = 377g/L] e nos primeiros estágios de vida do *Danio rerio* [CENO (10 dias) = 25 mg/L] (FERRARI *et al.*, 2003).

3.4.1 Carbamazepina nos sistemas de tratamento atuais

Uma vez administrados, os fármacos podem atingir o ambiente de forma variada, tanto como metabólitos ativos ou como compostos parcialmente metabolizados (ZUCATTO *et. al.*, 2005).

Na Tabela 6 apresenta-se a eficiência de remoção de fármacos em plantas de tratamento de esgotos. Dada sua persistência no ambiente, pode até ser usada como um parâmetro para detecção de presença humana pelo ambiente aquático (CLARA *et. al.* 2004).

De acordo com o trabalho de Clara *et al.* (2004), a carbamazepina apresenta uma degradação bastante lenta nos atuais sistemas de tratamento, independentemente do tempo de retenção de sólidos. Heberer (2002) e Webb *et al.* (2003) relatam que a persistência desta substância representa um fator de risco potencial nas reservas de água de consumo humano.

3.4.2 Impactos da Carbamazepina

Os resultados coletados por Ferrari *et.al.*(2003) demonstram que dentre todos os fármacos detectados na maior parte dos efluentes, a carbamazepina parece ser o composto mais perigoso para o ecossistema aquático. Entre todas as ferramentas para a análise de risco para fármacos, estudos de efeitos crônicos parecem ser os mais adequados.

Tabela 6 Eficiência de remoção afluente e efluente de fármacos em plantas de tratamento de esgotos.

Composto	Afluente (µg/L)	Efluente (µg/L)	Remoção (%)	Referência
Analgésico/antiinflamatório				
AAS	3,2	0,6	81	Ternes <i>et al.</i> (1999)
AS	57	0,05	99	Metcalfe <i>et al.</i> (2003 ^a)a
Diclofenaco	3,0	2,5	17	Heberer (2002)
Ibuprofen	38,7	4	>90	Buser <i>et al.</i> (1999)
β - bloqueadores				
Metropolol	n.r.	n.r.	0 – 10	Andreozzi <i>et al.</i> (2003a)c
Propanolol	70	304	0	Roberts and Thomas (2005)a
Atenolol	n.r.	n.r.	< 10	Andreozzi <i>et al.</i> (2003a)c
Antilipênicos				
Benzafibrato	1,18	0,6 – 0,84	27 – 50	Stumpf <i>et al.</i> (1999)b
Fenofibrato	0,44	0,22 – 0,4	6 – 45	Stumpf <i>et al.</i> (1999)b
Ácido clofíbrico	1	0,68 – 0,88	15 – 34	Stumpf <i>et al.</i> (1999)b
Compostos neuroativos				
Carbamazepina	n.r.	n.r.	7 – 8	Ternes (1998)
Diazepan	0,59 – 1,18	0,1 – 0,66	93	Van Der Hoeven (2004)

n.r.: não reportado. Fonte: FENT *et al.*(2006)

Segundo Sanderson *et al.*,(2004) a carbamazepina apresenta grande estabilidade no ambiente, com meia-vida média de 82 dias, mas esta atividade pode variar com fatores externos tais como: latitude, temperatura, insolação, quantidade de ácido húmico, nitrato dentre outros, o que pode elevar sua meia-vida para 100 dias (VOGNA *et al.*, 2004, ANDREOZZI *et al.*, 2002). Este composto tem características

tanto hidrofílicas quanto lipofílicas, que lhe confere boa mobilidade no solo (SWANN *et al.*, 1983).

Sacher *et al.* (1998) reportaram em seus estudos a presença de uma contaminação permanente da carbamazepina em vários rios na Alemanha, fato este atribuído à estabilidade e a taxa de reposição deste composto nesse tipo de matriz ambiental.

Segundo Tixier *et al.*, (2003), a carbamazepina apresenta concentrações relativamente altas quando comparadas às outras drogas presentes em matrizes ambientais. Estudos foram feitos para descrever possíveis efeitos agudos, porém o maior risco teve caráter crônico.

Em 1998 Ternes realizou análises químicas em águas de abastecimento, rios e lagos em vários países da Europa, nas amostras que a carbamazepina foi encontrada conjuntamente com outros fármacos (TERNES, 1998).

Ollers *et al.* (2001) reporta em seus estudos concentrações de 35ng/L a 800ng/L de carbamazepina em águas superficiais da Alemanha. Outros trabalhos realizados por Daughton e Ternes, (1999); Ollers *et al.*, (2001); Andreozzi *et al.*, (2003); Ternes, (2001); e Vogna *et al.* (2004) em países como Suíça Itália, França, Grécia e Suécia demonstram a presença da carbamazepina em concentrações semelhantes.

Fent *et al.* (2006) relataram concentrações de até 6,3 µg/L de carbamazepina em efluente de estações de tratamento de esgoto.

No Brasil estudos com a carbamazepina, Tegretol como é chamado comercialmente, ainda são raros, talvez inexistentes, mas se sabe que sua venda e de seus genéricos geram em torno de 23 milhões de reais anuais, sua distribuição é garantida pelo sistema único de saúde, já que 1,5% da população brasileira possui problemas relacionados à epilepsia (VOGT, 2002).

3.4.3 Normas nacionais

Embora o Brasil conte com um arcabouço legal que caracterize as águas quanto a sua qualidade e mencione a quantidade permitida para emissão de vários poluentes, não é citada em momento algum a poluição por parte de produtos farmacêuticos especificamente.

Não há muitos estudos no Brasil sobre a quantidade desses produtos nos rios brasileiros, embora ainda pode-se contar com algum dispositivo legal para balizar a investigação de produtos com características específicas como as da carbamazepina, objetivo deste trabalho.

No Brasil, a Portaria Normativa nº 84 IBAMA (Brasil, 1996) prevê a realização de testes de bioconcentração em peixes quando a substância apresentar uma das seguintes características: $\log K_{ow} > 2,0$, solubilidade em água $< 1,0$ mg/l, tempo de meia-vida > 4 dias, baixa degradabilidade em solução aquosa.

Características como essas qualificam a carbamazepina como um fator potencial de risco tanto para a saúde humana, como para animais de vida aquática. Todos os parâmetros citados no parágrafo anterior, de acordo com o Sistema QSARs (Quantitative Structure - Activity Relationships), são excedidos pela carbamazepina. Este programa (QSARs) tem sido extensivamente utilizado (SANDERSON et. al. 2004).

3.5 Processo Oxidativo Avançado (POA)

No presente capítulo é descrita a dinâmica do processo de oxidação no qual é conjugado a peroxidação assistida por luz ultravioleta (UV/H₂O₂) e sua aplicação em alguns contaminantes, em especial, a carbamazepina. Este tipo de processo oxidativo avançado foi escolhido por já ter sido usado para um amplo leque de poluentes

diferentes. A facilidade de operação e baixo custo do referido processo foram, também, fatores determinantes para sua escolha (HUANG *et al.*, 1993).

Atualmente, no mercado pode-se lançar mão de várias opções de sistemas de tratamento terciário destinados a uma variada gama de tipos efluentes. Tal fato é impulsionado principalmente pela crescente aperfeiçoamento das normas em vigor que tratam de controle ambiental.

4.1 O Processo Oxidativo Avançado UV/H₂O₂

O processo UV/H₂O₂, como grande parte dos POA é, principalmente, usado para oxidação de compostos resistentes à degradação, ou seja, contaminantes recalcitrantes, que é o caso da carbamazepina. Neste processo ocorre a dissociação da molécula de H₂O₂ pela luz UV, o que origina radicais •OH, e estes promovem a oxidação do composto em questão como explicado por Benitez *et. al.* (1996).

Tabela 7 Processos oxidativos avançados:

Sistemas	Composição dos aparelhos
Sistemas Homogêneos com Radiação	O ₃ /UV UV/H ₂ O ₂ Ultrassom H ₂ O ₂ / Ultrassom
Sistemas Homogêneos sem Radiação	O ₃ / H ₂ O ₂ O ₃ /OH ⁻ H ₂ O ₂ / Fe ²⁺
Sistemas Heterogêneos com Radiação	TiO ₂ /UV TiO ₂ / H ₂ O ₂ /UV
Sistemas Heterogêneos sem Radiação	Eletro- Fenton

Fonte: Huang *et al.* (1993)

Como pode ser visto na Tabela 8, o radical $\bullet\text{OH}$ é uma das espécies oxidantes mais fortes usadas em processos de tratamento de água e efluentes, e oferece um grande potencial de aceleração na oxidação do contaminante.

Tabela 8 Potencial de oxidação de alguns oxidantes na água

Oxidante	Potencial de Oxidação (eV)
$\bullet\text{OH}$	2,80
O	2,42
O_3	2,07
MnO_4^{-2}	1,67
Cl_2	1,49
Cl	1,36

Fonte: Legrini *et. al.* (1993)

O processo UV/ H_2O_2 tem uma vantagem devido sua simplicidade. O único composto químico necessário é a água oxigenada, H_2O_2 , que pode ser adquirida em solução a 30 % e é facilmente estocada e preservada quanto à possível degradação. Na Figura 3 está representada uma molécula de peróxido de hidrogênio.

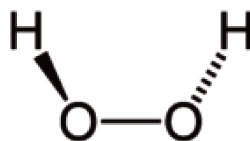


Figura 3 Molécula de peróxido de hidrogênio.

Fonte: Wikipedia 19/08/08

O processo UV/H₂O₂ é apropriado para pequenos sistemas que requeiram o mínimo de manutenção, operação intermitente ou ambos. Em casos onde o composto alvo ou outras substâncias presentes na água absorvam fortemente a radiação ultravioleta, o processo UV/H₂O₂ pode não ser muito eficiente, justamente devido à ausência de fótons, em quantidade, e com energia suficiente para iniciar a reação de formação significativa do radical hidroxila, ou seja, o rompimento da ligação entre os dois átomos de oxigênio presentes na molécula do oxidante original (HUANG *et al.* 1993).

A produção da radiação ultravioleta é feita, geralmente, por lâmpadas de mercúrio de baixa pressão com pico de emissão no comprimento de onda de 254 nanômetros. Sempre que possível é desejável o uso de lâmpada UV com comprimento de onda adequado para a absorção da radiação pelo H₂O₂, que ocorre na faixa de 220 nanômetros. Uma solução é o uso de lâmpadas de Hg com xenônio, que exibem forte emissão na região espectral de 210-240 nanômetros, o qual confere com o maior coeficiente de absorção molar do H₂O₂ (LEGRINI *et. al.*, 1993). Entretanto, na maioria dos trabalhos são utilizadas lâmpadas de Hg, que são facilmente encontradas no comércio e que possuem uma eficiência adequada para esse tipo de processo.

3.7 Aplicações e suas características

Para a degradação do p-clorofenicol, Ghaly *et. al.* (2001) utilizaram o processo UV/H₂O₂, com o qual pode comprovar que a velocidade de degradação do composto estudado aumentava com o aumento da concentração de H₂O₂. Entretanto, esse efeito foi constatado apenas até um limite na concentração de H₂O₂, a partir do qual a degradação tornou-se menos eficiente que a fotólise direta do p-clorofenol. Domènech *et. al.* (2001) demonstraram que o excesso de peróxido de hidrogênio pode afetar a degradação de um composto, devido à ocorrência de reações competitivas como as do esquema a abaixo:



Durante a degradação da carbamazepina, utilizando-se o processo oxidativo avançado UV/H₂O₂, Vogna *et. al.* (2004) reportaram a formação de um composto chamado acridina. A acridina apresenta uma toxicidade maior do que seu composto de origem e sua formação ocorre em maior quantidade aos 20 minutos do início do processo de degradação. Na Figura 4 pode ser visualizado o mecanismo de degradação da carbamazepina por tal processo, onde são vistos o composto original e vários intermediários obtidos por diferentes rotas de oxidação.

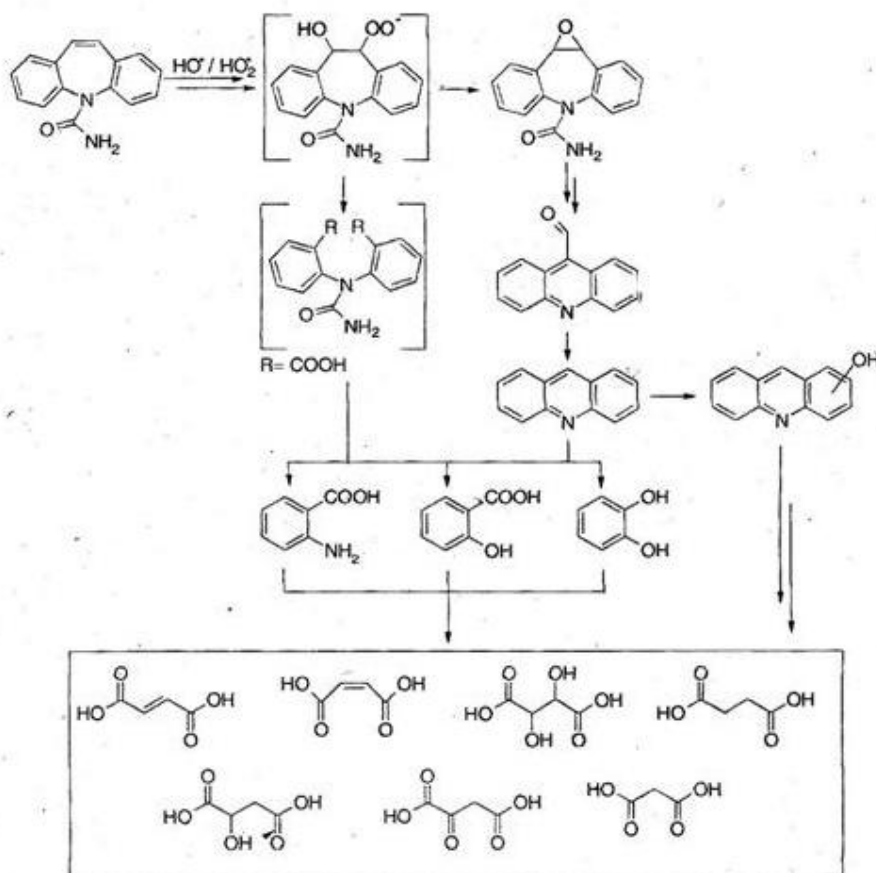


Figura 4 Etapas da degradação da carbamazepina por UV/H₂O₂ Fonte: Vogna *et. al* (2004)

De acordo com Marco *et. al.* (1997), as reações oxidativas, mudam a estrutura e também as propriedades químicas das substâncias orgânicas, rompendo as moléculas em fragmentos e aumentando o número de oxigênio presente nelas.

Uma forma para se qualificar a degradação é por meio de testes de toxicidade. Assim pode-se também determinar, se durante o tratamento de degradação do composto alvo estão se formando intermediários mais ou menos tóxicos (JARDIM *et. al.*, 1997).

Normalmente, o objetivo principal do tratamento oxidativo avançado não é o de mineralizar o composto completamente, e sim preferivelmente convertê-lo em subprodutos que sejam biodegradáveis aos processos de tratamento biológicos convencionais. Esta alternativa se mostra mais atraente no seu aspecto financeiro, pois o maior gasto é representado no processo químico de degradação da molécula atrelado a um processo tal qual de lodo ativado, o abaixa o custo total do sistema de degradação (ADAMS e KUZHIKANNIL, 2000).

Como foi proposto pelos autores do parágrafo anterior, no presente trabalho foi adotada essa mesma seqüência de processos para permitir a otimização da degradação da carbamazepina, visto a impossibilidade de a molécula ser degradada de maneira eficaz somente pelo processo biológico. Assim, além da molécula ser parcialmente oxidada, neste trabalho, será atrelado a um processo biológico, ou seja, uma conjugação de processos para otimização do possível sistema.

Materiais e Métodos

4.1 Proposta Metodológica

Os experimentos foram conduzidos em etapas distintas como na Figura 5, onde, numa primeira fase foi avaliado o potencial de biodegradação da carbamazepina por via microbiana direta. Numa segunda fase foi avaliada a oxidação do composto por processo oxidativo avançado (UV/H₂O₂), feita a avaliação da capacidade de biodegradação do composto, e realizado um ensaio de respirometria baseado no Teste Gledhill-modificado e IBAMA (1998).

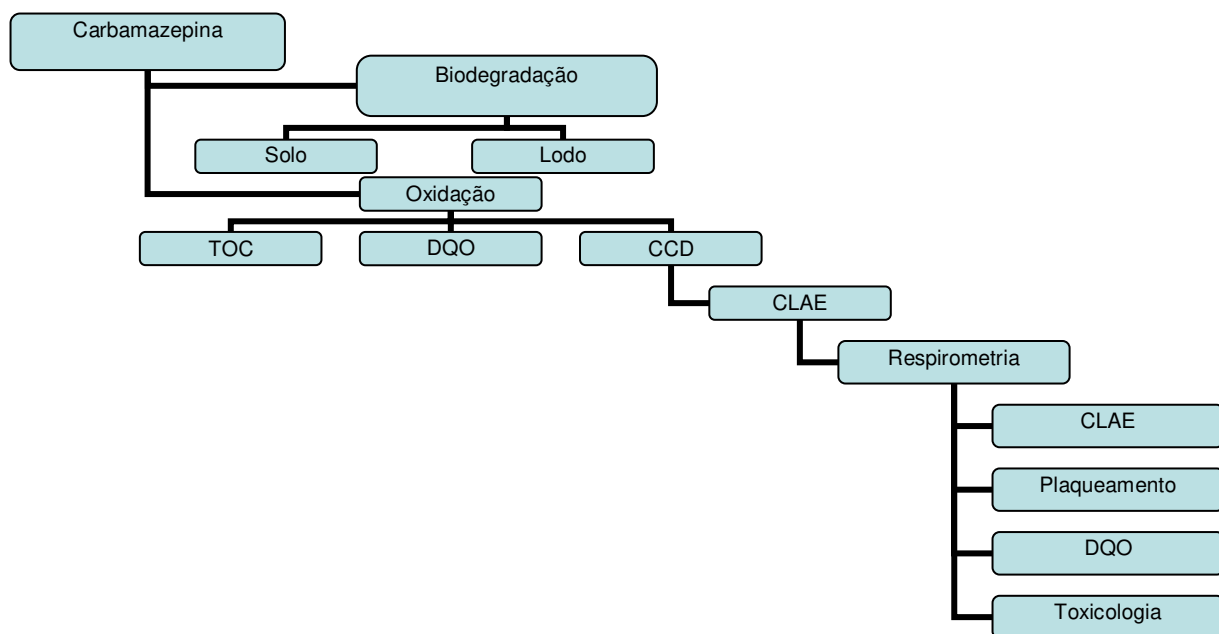


Figura 5- Organograma dos experimentos realizados

Paralelamente ao ensaio de respirometria, foi realizado plaqueamento utilizando meio de cultura PCA, visando a avaliar as qualidades do pré-inóculo e inóculo e o desenvolvimento dos microrganismos presentes durante o período de duração do teste, que não excedeu 28 dias.

A análise quantitativa foi realizada utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), onde foi avaliada a percentagem de biodegradação do fármaco durante o período do teste de respirometria.

As análises de Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Carbono Orgânico Total (COT) foram realizadas visando a avaliar o processo de biodegradação e oxidação.

Os testes de toxicidade aguda foram conduzidos simultaneamente à avaliação de biodegradação.

Uma avaliação preliminar do composto em estudo foi realizada através de dados obtidos na literatura como também avaliados segundo o modelo de relação quantitativa de estrutura e atividade (QSAR's).

4.2 Locais de realização dos experimentos

As etapas da pesquisa proposta foram desenvolvidas na Divisão de Microbiologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica da UNICAMP, Laboratório de Saneamento e Ambiente (Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo – Departamento de Saneamento e Ambiente - UNICAMP) e Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - USP (IPEN) onde foram conduzidos os ensaios de toxicidade aguda.

4.3 Fonte

4.3.1 Químicos

O composto carbamazepina **CAS 298-46-4** foi adquirido da TCI America com grau de pureza >97% e de sua formulação comercialmente vendida. Este composto foi utilizado para nos experimentos de oxidação, biodegradação, ensaio de respirometria e ensaios de toxicidade aguda.

4.4 Avaliação da Carbamazepina CAS 298-46-4 - pelo modelo de relação quantitativa entre estrutura e atividade QSARs

A avaliação do potencial de biodegradação da carbamazepina foi realizada utilizando o programa de modelagem QSAR (ECOSAR) utilizado pela U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). Este programa é utilizado por vários pesquisadores em estudos do comportamento de moléculas químicas em matrizes ambientais e também quando estas são submetidas aos processos convencionais de tratamento de efluentes.

O programa ECOSAR pode ser obtido gratuitamente via website da USEPA (<http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuite.html>) EPA (2007).

4.5 Avaliação do potencial de biodegradação direta da carbamazepina por microrganismos do lodo ativado e do solo

A avaliação do potencial de biodegradação direta da carbamazepina foi realizada segundo o método descrito por SILVA *et. al.*, 2000.

O objetivo deste ensaio foi promover nas populações microbianas de lodo ativado e solo uma adaptação frente ao composto em estudo utilizando-o como fonte de carbono e energia (catabolismo) ou utilizando este composto como fonte secundária de carbono (co-metabolismo). A seguir é descrita a metodologia do ensaio.

4.5.1 Enriquecimento das amostras

Solo – amostras foram coletadas na camada superficial do solo agrícola (10 cm) próximo a áreas de rizosferas, colocadas em sacos de plástico e levadas ao laboratório. Cerca de 100 g deste solo foram incubadas em frascos de Erlenmeyers, com suplementação de carbamazepina em diferentes concentrações. Sucessivas reaplicações do fármaco no sistema teste foram realizadas a intervalos semanais.

O solo foi incubado no escuro a 28°C, por um período de 30 a 60 dias, observando-se periodicamente a umidade. Quando este apresentava-se seco o solo era borrifado com água destilada sem deixar escorrer.

As concentrações de carbamazepina utilizadas para este experimento foram 2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625 mg/mL.

Lodo ativado – amostras de lodo ativado foram coletadas em garrafas plásticas de 5 litros no retorno de lodo do reator de lodo ativado, na Estação de tratamento de Esgoto – Samambaia no Município de Campinas, e levadas ao laboratório. Cerca de 100 mL deste lodo foram incubadas em frascos de Erlenmeyers de 250 mL, sob agitação 150 rpm, 28°C em shaker. Os frascos foram suplementados com 1% de solução de carbamazepina nas mesmas concentrações mencionadas acima e reaplicações do fármaco que foram realizadas para as amostras de solo.

4.5.2 Identificação de colônias bacterianas metabolicamente ativas

A identificação das colônias metabolicamente ativas foi realizada preparando o meio sitérico sólido (Agar), ver tabela 9, pH 7,0 contendo 25mg/L de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT) e diferentes concentrações.

Tabela 9 Meio Sintético.

NaNO ₃	3g
KH ₂ PO ₄	1g
MgSO ₄	0,5g
KCl	0,5g
FeSO ₄	0,01g
CTT	25 mg
H ₂ O destilada- q.s.p.	1000 mg/L

Fonte: SILVA *et. al.*, 2000.

Quatro amostras de 10 g de solo foram diluídas em série, em solução salina (0,08%) até a diluição de 10^{-6} . Alíquotas de 100 μL de cada diluição foram plaqueadas em duplicata em meio contendo a carbamazepina nas mesmas concentrações originais e o indicador CTT. Para as amostras de lodo (meio líquido) foram coletadas alíquotas de 5 mL diretamente do Erlenmeyers e realizado o mesmo procedimento executado no solo.

A identificação dos microrganismos metabolicamente ativos para a degradação da carbamazepina foi realizada por observação das colônias que apresentavam coloração rosado-vermelha, indicando atividade metabólica.

Embora a redução do CTT não confirme que a degradação de um composto ocorra, ela indica que os microrganismos presentes são metabolicamente ativos. O CTT é convertido, por células ativas, a um composto insolúvel colorido ou fluorescente, o formazan (MELO, 2000) apud Silva (2002).

4.6 Oxidação em reator de UV/H₂O₂

Dentre todas as alternativas para formação de radicais hidroxila, $\bullet\text{OH}$ (Tabela 7), neste trabalho foi utilizado o UV/H₂O₂, um conhecido processo oxidativo avançado (POA), que utiliza o peróxido de oxigênio na presença de luz ultravioleta, e foi aplicado para a decomposição da carbamazepina. Este processo foi escolhido dentre vários outros existentes, pelos motivos já detalhados anteriormente, e também, disponibilidade de recursos e do próprio reator.

4.6.1. Montagem do equipamento

Para o processo de oxidação da carbamazepina foi utilizado um reator construído em vidro com capacidade nominal de 750 mL. A lâmpada de mercúrio utilizada foi de 125W com comprimento de onda de 254nm. Esse conjunto foi resfriado por orifícios (entrada/saída) ligados à rede de abastecimento, o qual promove a temperatura próxima de 25 °C. As Figuras 6 e 7 ilustram esta unidade.



Figura 6 Reator de UV/ H₂O₂ montado no suporte universal juntamente com agitador magnético.



Figura 7 Partes que constituem o reator de cima para baixo são: bulbo da lâmpada de mercúrio, sistema de refrigeração com água corrente e recipiente de amostra.

4.6.2. Operação do reator

O reator foi operado em sistema de batelada onde foi fixado um volume de reação de 500 mL sendo preparada uma solução de carbamazepina em concentrações de 10 e 15 ppm e adicionado 16 e 26 ppm de uma solução de peróxido de hidrogênio a 30%. Essas soluções foram obtidas para se ter um número mínimo de 20 moléculas de peróxido para 1 de carbamazepina. O tempo de contato no reator foi no máximo de 60 minutos. As bateladas foram feitas a períodos de contatos de 5, 15, 30, 45 e 60 minutos.

Para melhor homogeneização da solução foi posicionado abaixo do reator um agitador magnético (Fisatom[®]) operados a 200 rpm. O H₂O₂ residual foi inertizado com catalase bovina e o residual foi mensurado com fitas de indicação peroxid-test Merck.

Aqui foi utilizada uma lâmpada de vapor de mercúrio de 254 nanômetros, o mesmo comprimento de onda que Beltran *et al.* (1993) utilizou para tratar a atrazina e 125 watts de potência.

Aliquotas de 15 mL de amostras colhidas do reator foram transferidas para um funil de separação de 1000 mL com 30 mL de clorofórmio. Esta solução foi agitada vigorosamente por 5 minutos e deixada em repouso em suporte para o aparecimento de duas fases na solução, o clorofórmio foi transferido para um outro recipiente e novamente foi adicionado ao funil 30 mL de clorofórmio. Este procedimento foi realizado em 3 vezes. Todas as alíquotas do clorofórmio foram juntadas, e colocadas em um balão de fundo redondo de 250 mL.

Em inglês a Cromatografia em camada delgada é conhecida como TLC (*thin-layer chromatography*), a qual utiliza um líquido como fase móvel e um sólido como fase estacionária. Na fase estacionária ocorre a retenção, por absorção, das substâncias eluídas pela fase móvel. A constituição da fase estacionária pode variar sendo sílica gel, alumina, terra diatomácea ou celulose e o suporte pode ser de vidro ou metal.

O conteúdo do balão foi submetido à evaporação a 40 °C a 80 rpm até a secura em sistema de rota evaporação sob vácuo. Após este processo a amostra foi solubilizada com 1 mL de acetona.

Amostras de 50 µL foram aplicadas, com o auxílio de seringa de vidro de 10µL (Merck®), por ponto em folhas de alumínio com fase estacionária de sílica gel para cromatografia em camada delgada (Merck®). Para cada batelada foram aplicadas na placa de CCD 4 pontos de uma solução padrão de carbamazepina, com concentrações de 3, 5, 7 e 10 mg/mL e as amostras provenientes das bateladas realizadas no reator UV/H₂O₂ tal como na Figura 8.

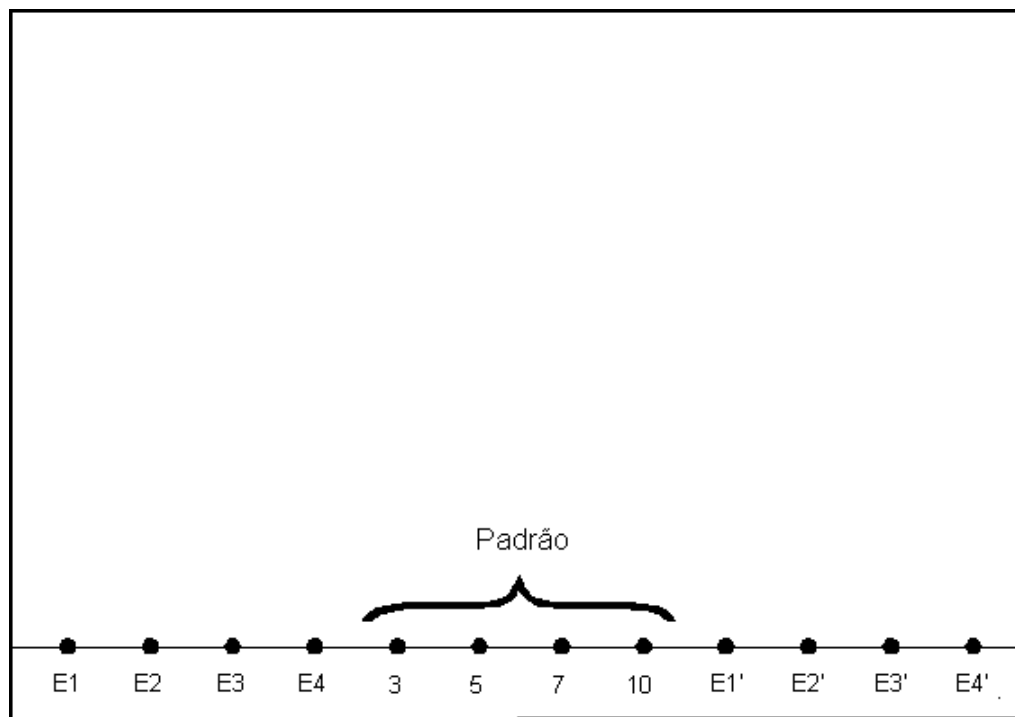


Figura 8 - Esquema de placa de CCD com seus pontos de aplicação

A cromatoplaça (fase estacionária) com todos os pontos de aplicação foi transferida para uma cuba de vidro com tampa, posicionada verticalmente com a solução eluente (fase móvel) composta de: 4,8g de ácido cítrico, 130 mL de H₂O destilada e 870 mL de n- butanol o que corresponde a 0,5 cm da altura da placa na cuba.

A placa foi deixada em repouso junto com a fase móvel tendo o cuidado de verificar periodicamente o arraste da fase móvel (solvente) o qual caminha sobre a placa por capilaridade e arrasta a substância menos adsorvida separando-a das substâncias mais adsorvidas. Este processo deve ser interrompido quando a fase móvel atingir 0,5 cm da parte superior da placa. A Figura 9 apresenta um esquema do processo.

Após este período a placa foi retirada da cuba e colocada para secar em estufa a 40°C por um período de 4 horas. Em seguida a placa foi submetida a um processo de revelação para observação dos resultados. A solução reveladora composta por: 3g de permanganato de potássio, 20g de carbonato de potássio, 5 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio a 5% e 300 mL de H₂O destilada foi aplicada na placa com o auxílio de um borrifador manual.

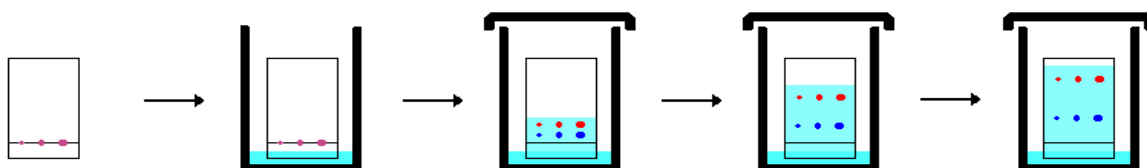


Figura 9 Processo de Cromatografia em Camada Delgada

Fonte: internet Wikipédia (2008)

Os resultados destas análises são expressos em R_f, que é medido pelo deslocamento da molécula pela placa do ponto inicial subtraído pela altura restante.

4.8 Teste da biodegradabilidade imediata em sistema fechado, baseado no Teste de Gledhill-modificado, (IBAMA, 1988)

O teste de biodegradabilidade imediata é um teste respirométrico (biodegradação) no qual se avalia a habilidade da substância a ser metabolizada por microrganismos, em condições similares às do ambiente. Este ensaio foi baseado no método E1.1.3.- IBAMA, 1998.(Teste de Gledhill-modificado e adaptado)

4.8.1 Preparação do inóculo

Para a preparação do inóculo foi coletado cerca de 1 litro de lodo proveniente da mistura completa do tanque de aeração, de uma estação de tratamento de esgoto (ETE Samambaia, Campinas-SP). A amostra foi levada para o laboratório e mantida sob aerobiose com auxílio de ar comprimido a uma vazão de aproximadamente 4L/min, por um período de 4h, após a amostra foi homogeneizada sob agitação magnética por 3 minutos.

Em seguida o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos a 4°C, em centrífuga refrigerada, Incibrás, modelo Spin VI, sendo o sobrenadante desprezado.

O ensaio iniciou-se com a preparação do inóculo (item 5.8.1), que foi ressuspenso em volume de solução nutriente, conforme descrito pelo Método E1.1.3.- (IBAMA, 1998), que apresenta uma quantidade de células de $2,8 \times 10^6$ UFC/ml, medido através de plaqueamento em meio PCA.

A carbamazepina proveniente do processo oxidativo nos tempos de 5, 15, 30, 45 e 60 minutos de reação como também o composto puro, foram submetidos à metabolização por uma cultura mista de microrganismos oriundos de amostras de lodo, provenientes da mistura completa do tanque de aeração da ETE-Samambaia, localizada na cidade de Campinas-SP, ressuspendidas em solução nutriente mineral, conforme descrito na Tabela 9, em um frasco fechado, com 2/3 de volume de ar.

Paralelamente ao ensaio respirométrico realizou-se o acompanhamento do pH e desenvolvimento dos microrganismos envolvidos no processo de biodegradação, através do plaqueamento em meio PCA (Plate count agar).

Toda vidraria foi lavada com uma solução HCl-5N + etanol, na proporção 1:9, com objetivo de eliminar traços de carbono orgânico solúvel e materiais tóxicos.

Todas soluções utilizadas foram preparadas usando-se balança analítica, SHIMADZIU, mod.AX200, água milliQ, Deionizador MILLIPORE, mod.Simplicity, e vidraria analítica Pyrex. A solução nutriente é constituída adicionando-se 1ml de cada solução estoque preparada por litro de água. A constituição da solução nutriente pode ser visualizada na Tabela 10.

Inicialmente foi preparado 500ml de solução nutriente + 10ml de inóculo, cobertos com papel alumínio e pré-incubadas por 24h em agitador orbital, Tecnal, modelo TE420, a 100rpm, com controle de temperatura, mantida 20-25°C, visando à metabolização de substâncias orgânicas que porventura estivessem adsorvidas aos microrganismos do inóculo.

Tabela 10 Conteúdos para preparo da solução nutriente (cfe.descrito no item 4.4 do método E.1.1.3 - IBAMA)

Soluções estoque (conforme descrito no item 4.4.2)	Solução de fosfato e amônio P.A Solução de Sulfato de magnésio heptahidratado P.A Solução Cloreto de cálcio P.A Solução de Cloreto Férrico P.A Solução de elementos traços
--	--

Após 24h de pré-incubação das soluções nutrientes inoculadas foi adicionado o fármaco em estudo, para cada concentração a ser trabalhada, sendo devidamente homogeneizados e identificados.

Partindo-se dos frascos anteriormente preparados, o sistema foi fracionado em 10 frascos de 100ml, contendo 50ml de solução pré-incubada e introduzido, a cada amostra assim preparada, um frasco de Duran, com capacidade 5ml, contendo 4ml de

solução de hidróxido de bário-0,2N, visando absorver o CO₂ produzido durante a biodegradação (sistema de absorção de CO₂).

Este procedimento foi repetido para todas as concentrações e frascos. Desta forma totalizou-se 42 frascos de amostras, que foram avaliados durante o período máximo previsto para o ensaio, 28 dias.

Diariamente a solução de hidróxido de bário, contida no frasco de Duran, foi substituída por uma nova alíquota de 4ml, visando a evitar a saturação da mesma com o CO₂ produzido e conseqüente diminuição do pH no meio.

Durante os 7 primeiros dias do ensaio, foram retiradas amostras, de cada concentração (frascos), a cada 2 dias, e após este período em intervalos de 5-7 dias até o final do período do ensaio.

A cada retirada do conjunto de amostras do sistema, foi realizada uma sequência de tratamento que compreendeu os seguintes procedimentos:

- retirada do sistema absorção de CO₂;
- aferição do pHmetro, DIGIMED – mod.DM20, solução tampão marca Synth pH=7,0 e pH=4,0;
- medida e registro do pH da amostra;
- plaqueamento, em meio PCA, de 100 µl da amostra e,
- filtração em membrana, Millipore, HABGA 04700, HA 0,45µ (47mm); sistema de filtração Millipore .

As amostras filtradas foram transferidas para frascos identificados, resfriadas e congeladas, para posteriormente serem utilizadas nas análises de CLAE, DQO e toxicidade.

4.9 Avaliação do desenvolvimento dos microrganismos durante os ensaios de respirometria por plaqueamento

A avaliação dos microrganismos durante os ensaios de respirometria foi realizada através de plaqueamento “pour plate” em placas de Petri em meio de cultivo PCA.

O plaqueamento foi realizado utilizando 1 mL das amostras provenientes do sistema de biodegradação as quais foram submetidas a diluições seriadas e 100µL destas diluições foram transferidas para placas de Petri contendo cerca de 20 mL de meio PCA. Os plaqueamentos foram feitos em capela de fluxo laminar.

As placas devidamente preparadas e identificadas foram incubadas durante 24h, 30°C, em estufa bacteriológica, Fanen 502. Passado o período de incubação foi realizada a contagem das colônias nas placas e estas expressas em Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL)

4.10 Análise da biodegradação da carbamazepina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O método de análise utilizado para a quantificação da carbamazepina foi baseado no procedimento HPLC/UV -USP, Ed.29, pg 369, 2006.

Solução padrão: Realizou-se o preparo de solução estoque 200 µg/mL, a partir da carbamazepina **CAS 298-46-4** adquirido pela TCI America com grau de pureza de 97%. A partir da solução estoque foram preparados padrões nas concentrações 0,96; 1,92;

2,88; 4,8; 6,72; 9,6 e 19,2 µg/mL, as quais foram utilizadas no preparo da curva analítica de calibração da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A análise de biodegradação da carbamazepina das amostras provenientes do sistema de respirometria foram analisadas em Sistema cromatográfico: LC-DAD Alliance Waters, composto por bomba Waters 2695, Detector Waters 2996 e software Empower, Coluna L10 Phenomenex Luna CN (250 x 4,6 mm, 5µ). Como solução da fase móvel foi utilizado uma mistura de Água/Metanol/Tetrahidrofurano (85:12:3), 0,22 ml de ácido fórmico e 0,5 ml de TEA- trietilamina. A eluição das amostras foi realizada com uma vazão da FM – 1 ml/min, e detecção: $\lambda = 280$ nm.

Todas as vidrarias utilizadas durante os experimentos cromatográficos, foram lavadas com solvente de grau CLAE antes da utilização.

4.11 Avaliação da concentração de compostos de carbono através de análise quantitativa DQO (Demanda Química de Oxigênio) dos ensaios de respirometria e POA.

As análises de DQO foram realizadas para acompanhar o processo de biodegradação dos ensaios de respirometria e das amostras provenientes do processo oxidativo. A metodologia utilizada foi do fabricante (HACH), n.2710 adaptado da AWWA, 2007- Ed.21, Método 5220-D, colorimétrico de refluxo fechado. O reagente utilizado foi adquirido na faixa de 0-150 ppm, e detecção a 420 nm realizada em Espectrofotômetro HACH – modelo DR-4000.

Neste teste, que tem duração de 2 horas, emprega-se um oxidante forte (dicromato de potássio – $K_2Cr_2O_7$) em condições drásticas (meio ácido e temperatura elevada) na presença de um catalisador para promover a oxidação total a CO_2 e água.

4.12 Análise do Carbono Orgânico Total (COT) das amostras do processo oxidativo.

A análise de Carbono Orgânico Total foi realizada em um aparelho da marca Shimadzu, modelo TOC 5000^a. As amostras foram filtradas previamente com uma membrana Millipore de 0,45µm. As análises foram baseadas na quantidade de Carbono inorgânico detetado com um analisador infravermelho que foi obtida pela oxidação com aquecimento da amostra (680°C) que fornece o número de carbono total da mesma. A diferença destes dois valores é o carbono orgânico total. Método 5310 B (AWWA/APHA/WEF, 2007).

4.13 Testes de toxicidade

O ensaio de toxicidade é utilizado para a determinação do o efeito de substâncias a serem testadas em organismos, em condições controladas. Uma ampla variedade de organismos é utilizada para este fim. Neste trabalho foram selecionados dois tipos de organismos, o *Vibrio fischeri* e a *Ceriodaphnia dubia* como indicadores de possíveis impactos gerados ao ambiente. Na Tabela 11 são apresentados os ensaios de toxicidade realizados, organismos teste e respectivas metodologias.

Tabela 11 Ensaios de toxicidade utilizando a carbamazepina.

Toxicidade	Organismo-teste	Tempo de exposição	Atividade	Medida Final	Método
Aguda	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	24/48 h	Imobilidade e mortalidade	CE50	NBR 13373, ABNT, 2006
Aguda	<i>Vibrio Fischeri</i>	15 min	bioluminescência	CE50	NBR 15411-2 ABNT, 2006

CE50-Concentração efetiva do efeito observado em 50% dos organismos teste

4.13.1 Ensaios de Toxicidade crônica com *Ceriodaphnia spp* (Crustácea, Clarodela) método ABNT NBR 13373

Para realização do ensaio de toxicidade aguda, foi utilizada a *Ceriodaphnia dubia*. O método utilizado para a realização dos testes está descrito na Tabela 12.

Na Figura 10 apresenta uma foto do organismo teste utilizado nos experimentos.



Figura 10 Foto da *Ceriodaphnia dubia* – organismo-teste empregado na avaliação de efeito da droga a organismos aquáticos

Inicialmente foram realizados ensaios preliminares visando a avaliar a toxicidade do fármaco, estes testes compreendem os ensaios 1, 2 e 3 descritos a seguir.

Tabela 12 Condições teste – Toxicidade aguda *Ceriodaphnia dubia*.

Condições-teste	<i>Ceriodaphnia dubia</i>
Sistema de teste	Estático
Duração	24/48 horas
Temperatura	25 ± 1 ⁰ C
Intensidade luminosa	500 a 1000 lux
Fotoperíodo	16 h luz
Tamanho do frasco-teste	Frascos 50 ml
Volume da solução-teste	20 ml
Renovação da solução-teste	Não
Idade dos organismos	≤ 24 horas
Nº de organismos/réplica	01
Nº réplicas/concentração	10
Alimentação durante o teste	Sim
Água de cultivo	Natural reconstituída com dureza ajustada para 42-46 mg CaCO ₃ /L. Conforme descrito ABNT, 2006.
Critério de avaliação de efeito	Sobrevivência
Expressão dos resultados	Quantitativo: CE50 Qualitativo: efeito tóxico ou não tóxico
Critério de aceitação do teste	> 80% de sobrevivência

Fonte: ABNT, 2005.

4.13.1.1 Ensaio 1 Análise da toxicidade da solução de trabalho de carbamazepina

Este ensaio foi realizado para avaliar a toxicidade da carbamazepina na forma pura na *Ceriodaphnia dubia*.

Uma solução de carbamazepina pura (> 97%), com concentração de 10ppm sem tratamento. Foi feito um ensaio com 10 microrganismos por réplica.

4.13.1.2 Ensaio 2 Análise da toxicidade do H₂O₂ residual

A avaliação do peróxido de hidrogênio residual foi necessária neste caso para a obtenção de quanto poderia interferir na análise de toxicidade do restante das substâncias presentes nas amostras. Foi utilizada uma solução de 10ppm de carbamazepina a qual foi submetida ao processo de tratamento em reator UV/ H₂O₂, com período de reação de 60 min e um controle (água). O H₂O₂ residual neste caso não foi inertizado.

Esse experimento foi realizado com 4 réplicas e 5 organismos, com soluções de 100%, 10% e 1% das amostras provenientes do tratamento de oxidação.

4.13.1.3 Ensaio 3 Análise da toxicidade das amostras geradas na respirometria feita após tratamento UV/H₂O₂

A Avaliação das amostras neste caso se deve à suspeita de que os subprodutos gerados possam ser tóxicos, ou ter tais propriedades aumentadas. Para se avaliar somente a toxicidade dos subprodutos gerados foi feita a inertização do peróxido de hidrogênio residual.

Neste ensaio foram utilizadas as amostras provenientes do ensaio de respirometria, foram escolhidas três datas e três tempos de detenção em reator diferentes, 5, 15 e 60 minutos. No total foram geradas 9 réplicas com 5 microrganismos em cada uma delas.

Na Figura 11 apresenta-se a montagem do ensaio de toxicidade aguda com *Ceriodaphnia dubia*.



Figura 11 Montagem do ensaio de toxicidade aguda. Cada copo representa uma réplica

4.13.2 Ensaio de Toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* método ABNT NBR 15411

O método consiste na inibição da luminescência da bactéria marinha *V.fischeri* causada pela exposição a diferentes concentrações do agente tóxico, por um período de 15 e 30 min de exposição ou, opcionalmente, 5 min, a 15°C, nas condições prescritas na NBR método NBR 15411-2, (Parte II – Utilizando bactérias desidratadas), ABNT, 2006.

O equipamento utilizado para ensaios com *V.fischeri* (Figura 12), é um fotômetro específico onde podem ser posicionadas até 30 cubetas de vidro. Este equipamento é

composto de um espaço especial para o estoque do reagente (bactéria hidratada, 4°C; e um poço para a leitura do sinal (luminescência bacteriana).



Figura 12 Analisador de Toxicidade por fotoluminescência bacteriana - Modelo M 500 Microbics.

Este experimento, como o anterior, foi dividido em ensaios diferentes como será apresentado a seguir:

4.13.2.1 Ensaio 1 Análise da toxicidade da solução de trabalho de carbamazepina

Neste ensaio utilizou-se uma solução de carbamazepina a 10ppm.

4.13.2.2 Ensaio 2 Análise das amostras nos diferentes tempos de detenção

Neste ensaio utilizaram-se os tempos de detenção de 5, 15, 30, 45 e 60 minutos feitos no reator de UV/H₂O₂.

4.13.2.3 Ensaio 3 Análise de toxicidade das amostras geradas na respirometria feita após tratamento UV/H₂O₂

Este ensaio foi feito com as mesmas datas de coletas utilizadas no ensaio com *Ceriodaphnia dubia*, contudo somente nos tempos de 15 e 60 minutos. De acordo com Vogna *et. al.* (2004), a maior quantidade de subprodutos gerados com a oxidação da carbamazepina em processo UV/H₂O₂ ocorre em torno dos 20 minutos.

4.14 Descarte do material utilizado durante a realização da pesquisa

Todas as soluções e outros materiais gerados durante este experimento foram descartados conforme procedimentos específicos para cada situação ou classe de composto gerado.

4.14.1 Material biológico

Todo o material biológico gerado nos ensaios de respirometria, contagem em placas foram submetidos a processo de esterilização em autoclave (120°C, 15 min.) e posteriormente separados e acondicionados como resíduo comum. Vidraria e outros utensílios de laboratório foram lavados com detergente, álcool 70% e água destilada.

Ensaio de toxicidade

Para realização do ensaio de toxicidade aguda, *Ceriodaphnia dubia*, foram utilizado copinhos descartáveis os quais são pré lavados com água destilada antes do ensaio. Posteriormente as soluções-teste foram segregadas em frascos específicos e os copos descartáveis seguem para o descarte de resíduo de laboratório. Cubas e vidraria de soluções estoque seguem procedimento da ABNT específica para cada ensaio.

Para realização do ensaio de toxicidade aguda, *Vibrio fischeri*, as cubetas do “microtox” são esterilizadas em autoclave e descartadas.

4.14.2 Material químico

Todo o material químico (soluções e reagentes), utilizado nos experimentos de cromatografia, DQO, foram segregados e acondicionados em frascos de vidro e encaminhados para o depósito de descarte de resíduos químicos do CPQBA. A destinação final destes, resíduos, segue procedimentos específicos para cada classe de composto químico gerado.

5 Resultados

5.1 Avaliação da Carbamazepina CAS 298-46-4 - através do modelo de relação quantitativa entre estrutura e atividade QSARs

O potencial de biodegradação da carbamazepina foi avaliado pelo programa de modelagem Q-SARS utilizado pela U.S. Environmental Protection Agency (USEPA).

A utilização deste programa se faz necessário devido a ausência de dados na literatura sobre aspectos de biodegradação, bioacumulação e comportamento em estações de tratamento de efluentes. Este programa tem sido extensivamente utilizado e validado por diversos pesquisadores em seus trabalhos (MOORE *et al.*, 2003; SANDERSON *et al.*, 2004; TERNES 2004).

A carbamazepina analisada pelo modelo de relação quantitativa entre estrutura e atividade apresenta um coeficiente de partição octanol/água de 2,25 e o fator de bioacumulação calculado é de $FBC = 15,36$. Isto representa um potencial de bioacumulação baixo. NENDZA (1991) apud: ZAGATTO (2006) comentam que estas duas variáveis Kow e FBC são fundamentais para a determinação do potencial de bioacumulação de uma molécula, onde se assume que, compostos com valores de Kow $< 3,0$ ($FBC < 100$) não apresentam bioconcentração substancial; já os que possuem Kow entre 3 e 6 ($FBC > 100$) são classificados como altamente acumulativos.

Segundo este mesmo programa, quando a carbamazepina é submetida a uma estação de tratamento de esgoto este composto apresenta uma biodegradação de 0,1% e uma remoção total no processo de 2,98%. Esta remoção compreende a adesão aos flocos de lodo 0,92%, a presença deste composto no lodo final do processo 1,95% e 0,11% em outros fatores do processo. O efluente final apresenta uma concentração final da carbamazepina de 94,04%. Estes resultados indicam que este composto apresenta uma característica de recalcitrância com possível acumulação ambiental. Estas informações estão de acordo com o trabalho de JONES *et al.*, 2002, onde estes pesquisadores utilizaram este modelo para analisar a presença e permanência de vários fármacos na Inglaterra.

O modelo de fugacidade desta molécula mostra que 83,2% desta molécula podem ser encontrada no solo, e 16,7% dissolvida na água, com meia-vida de 337 dias no sedimento, 75 dias no solo e 37 dias na água. Sanderson *et al.*, 2004, Vogna *et al.*, 2004, ANDREOZZI *et al.*, 2002, contestam essa durabilidade em meio aquático, alegando que este composto possui uma meia vida em meio aquático de 82 dias podendo estender-se para 100 dias quando combinados com nitratos ou ácidos húmicos.

Os efeitos toxicológicos da carbamazepina apontados pelo programa mostram que este composto apresenta um efeito tóxico agudo (48 horas) e crônico (16 dias) em *Daphnia* com EC50=73 e 4,5 ppm respectivamente. Outros efeitos podem ser observados em peixes com LC50=66,1 ppm em 96 horas e LC50=9,1 em 30 dias.

5.2 Avaliação do potencial de biodegradação direta da carbamazepina por microrganismos do lodo ativado e solo

A avaliação do potencial de biodegradação direta da carbamazepina por microrganismos provenientes do lodo ativado e do solo não apresentaram resultados satisfatórios. Os resultados destas análises podem ser observados nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13 Avaliação do potencial de biodegradação direta da carbamazepina por microrganismos provenientes do lodo ativado.

Concentração/ Dias de plaqueamento	5	10	15	20	25	30	35	45	50	55	60
2,0 mg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,0 mg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5 mg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,12 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,062 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: + crescimento; - ausência crescimento.

Tabela 14 Avaliação do potencial de biodegradação direta da carbamazepina por microrganismos provenientes do solo.

Concentração/ Dias de plaqueamento	5	10	15	20	25	30	35	45	50	55	60
2 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5 ml/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,12 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,062 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: + crescimento; - ausência crescimento

Nestes experimentos tornou-se evidente o resultado negativo da utilização da carbamazepina como única fonte de carbono (catabolismo) ou processo de co-metabolismo auxiliado com a adição de glicose nos meios, para ambas as culturas testadas. Isto indica uma possível acumulação ambiental desta molécula.

Partindo destes resultados optou-se em usar um reator de UV/H₂O₂ para a oxidação do composto farmacêutico e analisar seus efeitos em processos biológicos de degradação.

5.3 Avaliação do processo oxidativo UV/H₂O₂ da carbamazepina por CCD em diferentes períodos de reação

Com os resultados obtidos através da análise por CCD observou-se que todos os períodos de reação de 5 a 60 minutos apresentaram modificação no R_f da molécula. No entanto, foi observado que ocorre variações com a molécula dependendo da sua concentração, da quantidade de H₂O₂ utilizado e tempo de reação.

A seguir são apresentados os resultados referentes aos 4 ensaios realizados:

Ensaio1- 10ppm de Carbamazepina + 16ppm H₂O₂

Ensaio2- 15ppm de Carbamazepina + 16ppm H₂O₂

Ensaio3- 10ppm de Carbamazepina + 26ppm H₂O₂

Ensaio4- 15ppm de Carbamazepina + 26ppm H₂O₂

Na Figura 13 mostra-se que quando utilizada concentração de 10 ppm de carbamazepina com 16 ou 26 ppm de H₂O₂ em um período de reação de 5 minutos, estas apresentaram diferentes R_f dos outros tratamentos indicando um possível efeito oxidativo da molécula para E1 e E3.

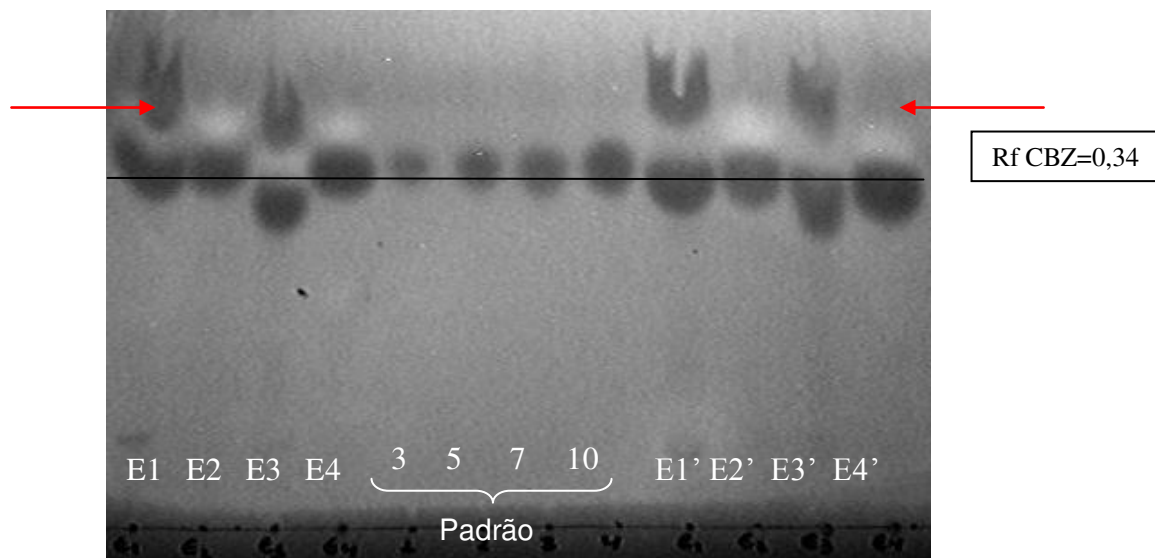


Figura 13 – Análise por CCD da Carbamazepina (CBZ) em concentração de 10 e 15 ppm após período de reação de 5 minutos em reator UV/H₂O₂ com adição de H₂O₂ nas concentrações de 16 e 26ppm

Na Figura 14 mostra-se que em concentrações de 10 ppm de carbamazepina com 16 ou 26 ppm de H₂O₂ em um período de reação de 15 minutos, estas apresentaram Rf diferentes dos outros tratamentos indicando um possível efeito oxidativo da molécula somente para E3.

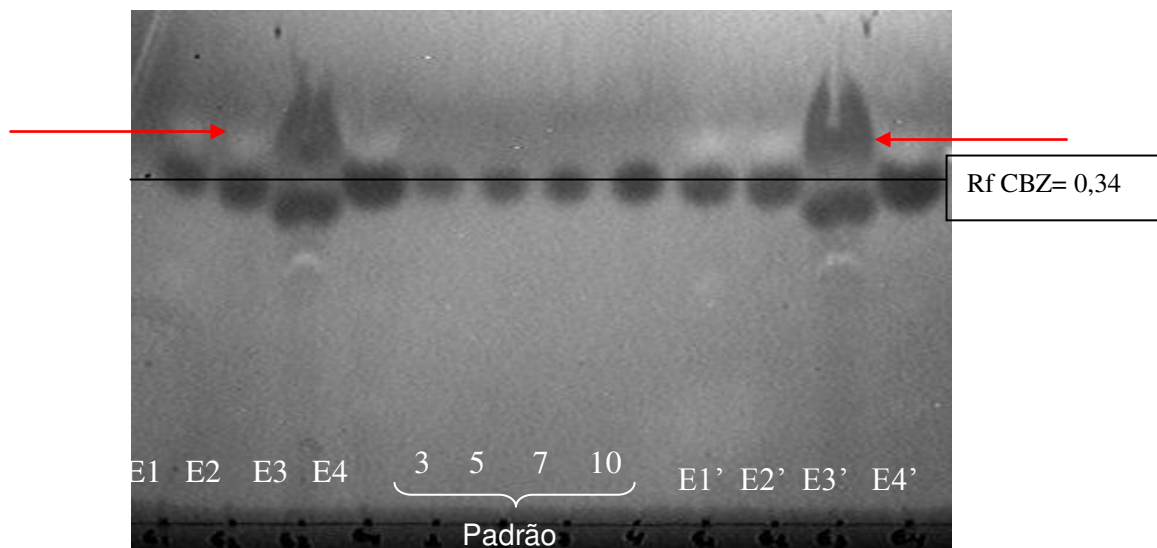


Figura 14 - Análise por CCD da Carbamazepina (CBZ) em concentração de 10 e 15 ppm após período de reação de 15 minutos em reator UV/H₂O₂ com adição de H₂O₂ nas concentrações de 16 e 26ppm

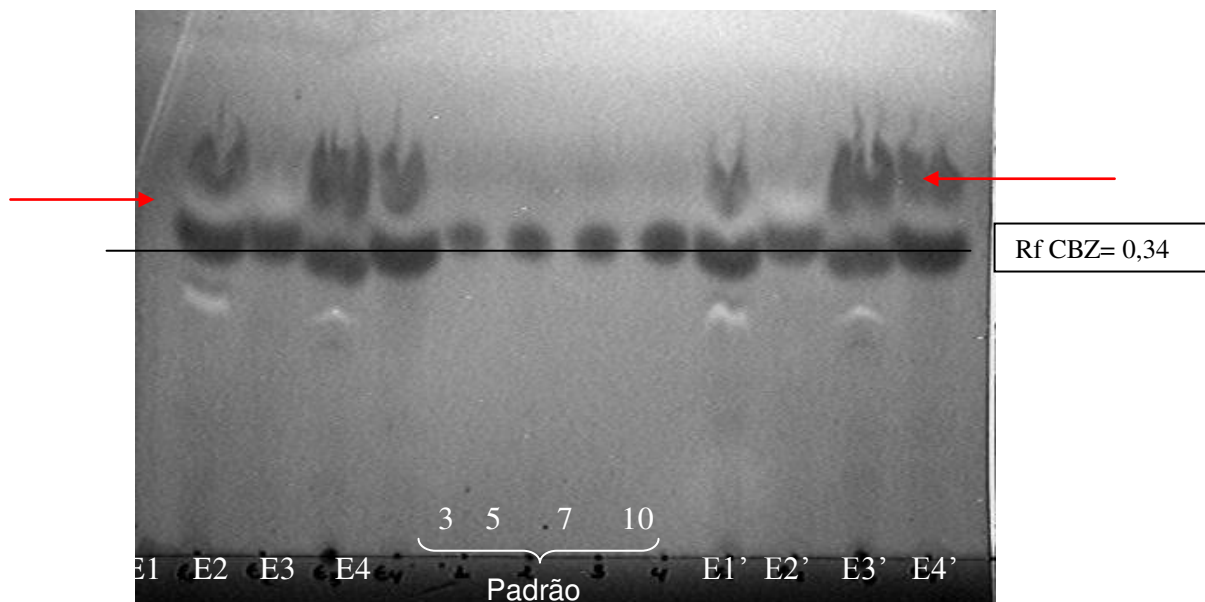


Figura 15 - Análise por CCD da Carbamazepina (CBZ) em concentração de 10 e 15 ppm após período de reação de 30 minutos em reator UV/H₂O₂ com adição de H₂O₂ nas concentrações de 16 e 26ppm

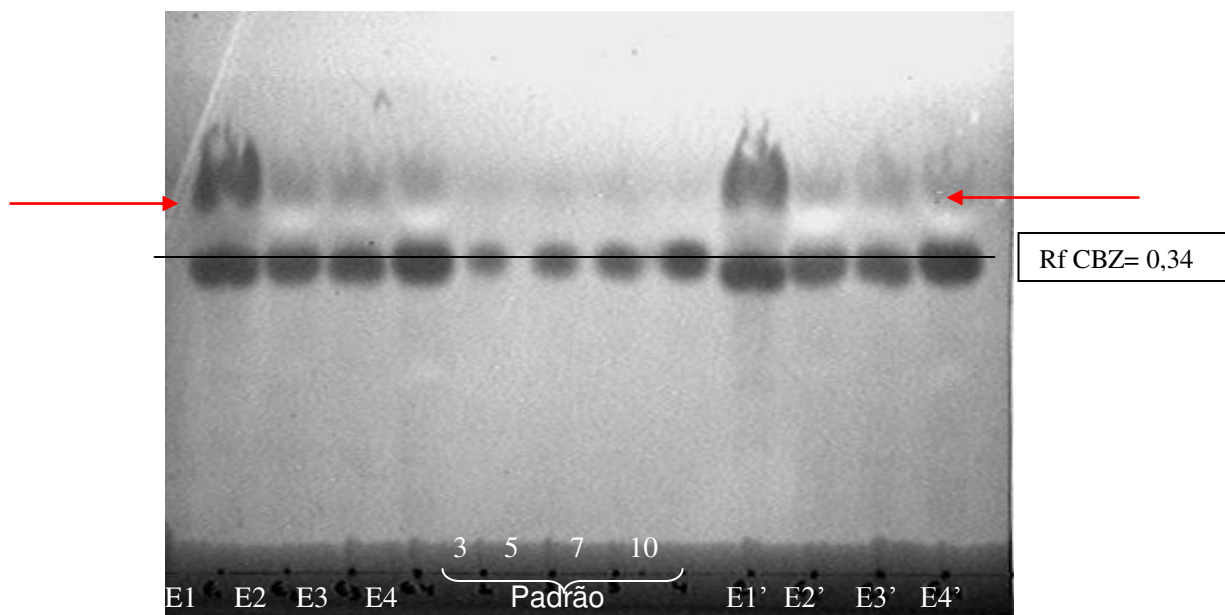


Figura 16 - Análise por CCD da Carbamazepina (CBZ) em concentração de 10 e 15 ppm após período de reação de 45 minutos em reator UV/H₂O₂ com adição de H₂O₂ nas concentrações de 16 e 26ppm

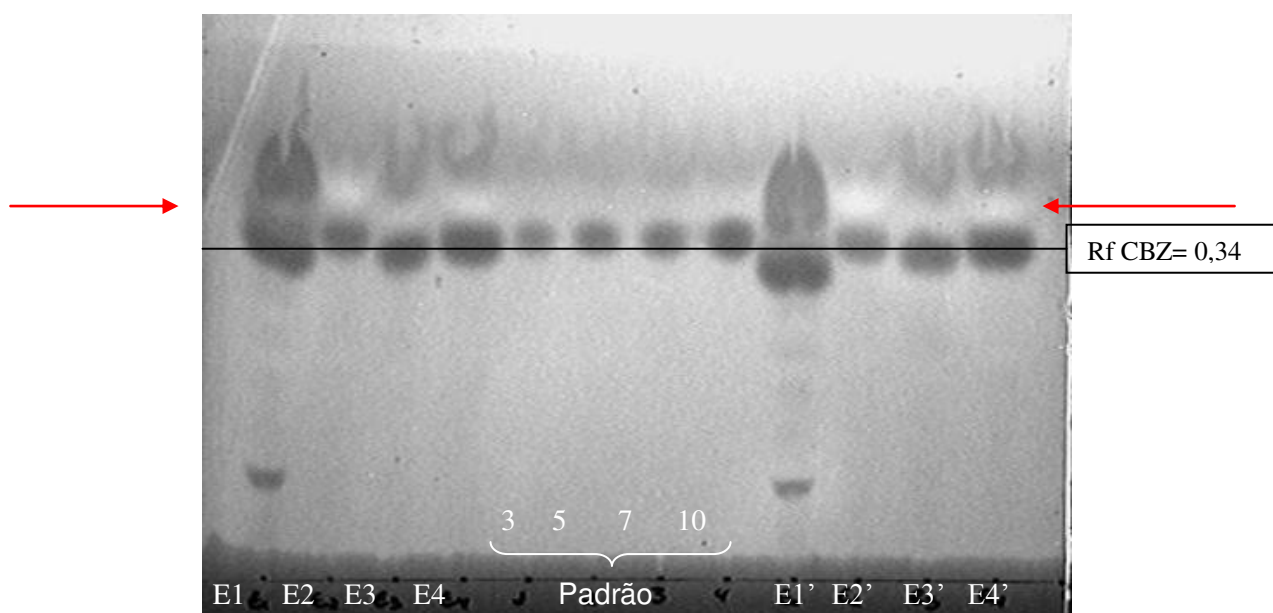


Figura 17 - Análise por CCD da Carbamazepina (CBZ) em concentração de 10 e 15 ppm após período de reação de 60 minutos em reator UV/H₂O₂ com adição de H₂O₂ nas concentrações de 16 e 26ppm

Analizando as Figuras 13 a 17 acima, pode-se concluir que a melhor concentração de carbamazepina a ser utilizada no processo oxidativo, foi a de 10 ppm. Quanto à quantidade de H_2O_2 utilizada pode-se notar que esta varia conforme o tempo utilizado. Quando foi utilizado um tempo de reação de 5 minutos, ambas as concentrações de H_2O_2 (16 e 26ppm), apresentaram resultados positivos. No tempo de 15 minutos de reação apenas a concentração de 26 ppm de H_2O_2 foi a que apresentou resultado satisfatório. No tempo de 30 minutos de reação a concentração de 15 ppm de carbamazepina com 26ppm de H_2O_2 foi a única que não sofreu reação durante o processo, as demais apresentaram oxidação. Nos períodos de reação de 45 e 60 minutos somente a concentração de 10 ppm de carbamazepina e 16ppm de H_2O_2 apresentou ser eficiente.

Com base nas informações obtidas pelos ensaios de CCD optou-se em realizar o processo oxidativo com 10 ppm de carbamazepina e 26 ppm de H_2O_2 , em um período de 15 minutos de reação. Esta decisão tem como base o trabalho realizado por Vogna *et.al*, 2004, onde estes autores relatam que quando a carbamazepina é submetida a processos de oxidação utilizando reator UV/ H_2O_2 , esta apresenta uma maior quantidade de subprodutos gerados durante este processo em um período de reação próximo a 20 minutos.

Um outro fator considerado para a escolha da concentração e tempo de reação foi que 10 ppm de carbamazepina é a concentração mais próxima à encontrada nos sistemas aquáticos e o período de 15 minutos mostrou ser eficiente e não muito extenso como os demais.

5.4 Análise do carbono orgânico total das amostras após tratamento do POA

Os resultados do COT referente ao processo de oxidação em reator UV/H₂O₂ realizado após o tratamento mostraram uma taxa de remoção de carbono da solução de 1% (Figura 18). Estes resultados indicam que o processo empregado não foi eficiente na modificação estrutural da molécula a nível de redução da quantidade significativa de carbono (CO₂ e H₂O) da solução teste.

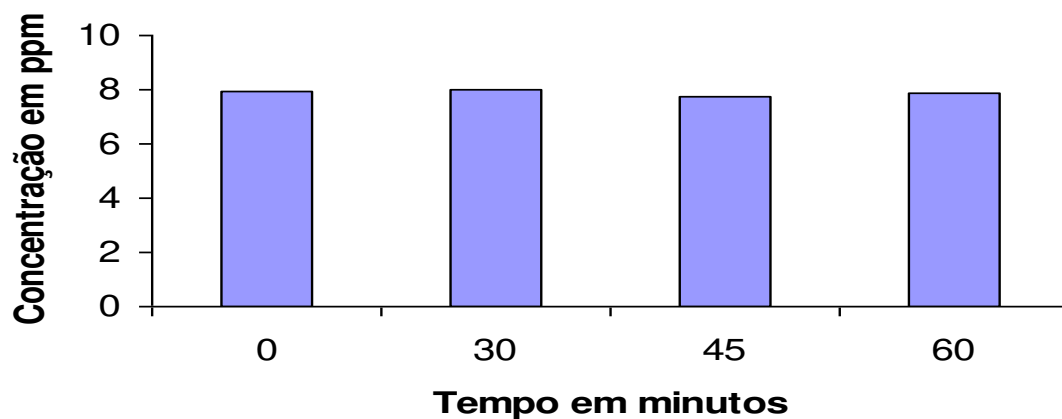


Figura 18 Análise de COT da oxidação da carbamazepina após os períodos de reação em reator UV/H₂O₂. Concentração inicial de 10 ppm. Período de reação de 0 a 60 minutos

5.5 Análise de DQO das amostras após tratamento do POA

A análise de DQO realizada a partir das amostras geradas do reator de POA nos tempos de reação de 5, 15, 30, 45 e 60 minutos não revela qualquer mudança significativa (Figura 19) como o constatado nas análises de COT. O tempo de 45 minutos apresentou um ligeiro aumento da concentração de DQO, este resultado pode ter ocorrido por algum erro experimental ou impureza provenientes da manipulação da amostra. Para atual situação este teste não se mostrou conclusivo, sua interpretação fica sujeita a uma grande quantidade de variáveis.

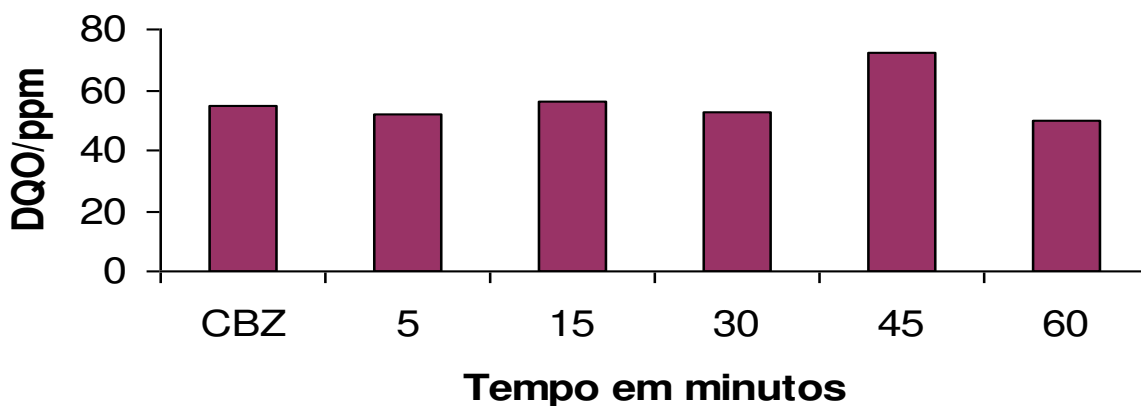


Figura 19 Análise de DQO da carbamazepina após os períodos de reação em reator UV/H₂O₂. Concentração inicial de 10 ppm. Período de reação de 5 a 60 minutos

Avaliação do pH durante o período de oxidação e biodegradação

Os resultados da avaliação do pH durante o processo de reação UV/H₂O₂ como também nos ensaios de biodegradabilidade, mostraram-se inalterados permanecendo este entre pH 4 e 5.

5.6 A avaliação do efeito do tratamento UV/H₂O₂ sobre a carbamazepina por CLAE

A avaliação do efeito do tratamento UV/H₂O₂ sobre a carbamazepina pode ser visualizada na Figura 20. Pode-se observar que durante o processo oxidativo houve uma redução da concentração inicial do fármaco (10 ppm) durante o período de tratamento de 5, 15, 30, 45 e 60 minutos. Neste trabalho não foram monitorados os subprodutos gerados após a reação UV/H₂O₂.

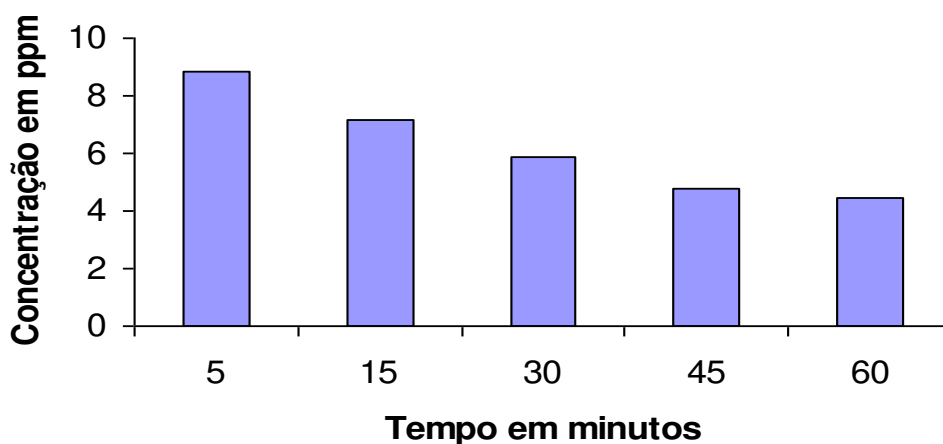


Figura 20 - Efeito do tratamento UV/H₂O₂ sobre a carbamazepina durante o período de reação de 5 a 60 minutos. Concentração inicial 10 ppm. Análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

5.7 Avaliação da biodegradabilidade da carbamazepina em sistema fechado, baseado no Teste de Gledhill-modificado, (IBAMA, 1988), analisado por CLAE

Os ensaios de respirometria (biodegradação) mostraram uma degradação de aproximadamente 1% do composto químico para todos os tratamentos realizados por processo oxidativo avançado UV/H₂O₂ utilizados Figura 21.

Os resultados indicam que os microrganismos não foram capazes de utilizar o fármaco como fonte de carbono e energia mesmo após o tratamento UV/H₂O₂. VOGNA *et. al.* (2004), em seus estudos de oxidação da carbamazepina obtiveram resultados satisfatórios quanto à degradação desta molécula. No entanto, estes pesquisadores utilizaram uma relação de 1/250ppm de carbamazepina e H₂O₂ respectivamente. Dados sobre a viabilidade de biodegradação dos produtos gerados não foram realizados nos trabalhos destes autores.

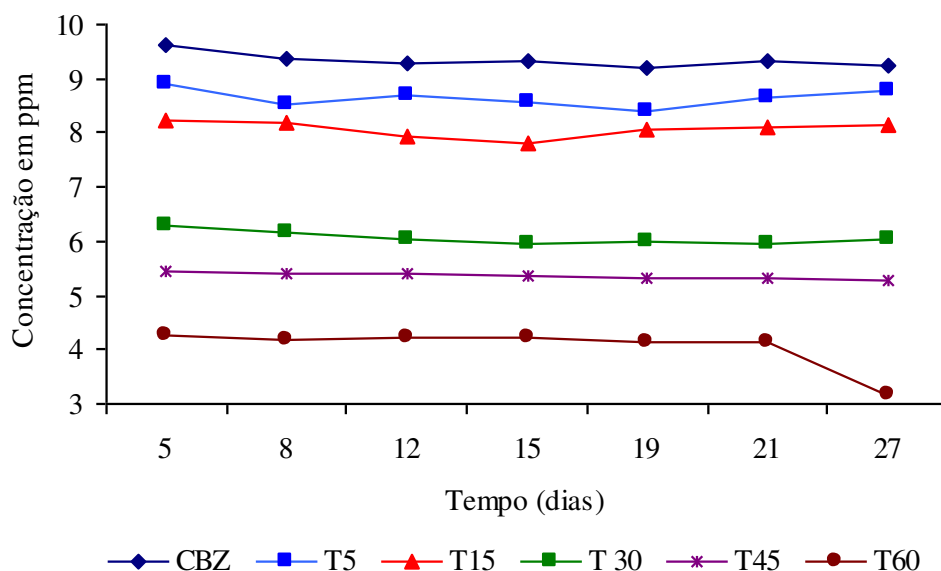


Figura 21 - Perfil de degradação da carbamazepina após ensaio de respirometria analisados por CLAE, T5 a T60 indica o tempo de detenção dentro do reator.

Outros pesquisadores como SANDERSON *et. al.*, (2004), ANDREOZZI *et. al.*, (2002), CLARA *et. al.* (2004), mostram em seus estudos a presença desta molécula em diferentes matrizes ambientais, concluindo a dificuldade de degradação nos atuais sistemas de tratamento.

5.8 Avaliação do desenvolvimento dos microrganismos durante os ensaios de respirometria por plaqueamento

A avaliação do desenvolvimento dos microrganismos durante o ensaio de biodegradação (Tabela 15), mostra um decréscimo acentuado do número de microrganismos viáveis presentes tanto para o composto puro como também para os ensaios realizados após o tratamento com UV/H₂O₂. Pode-se notar que o período de reação de 15 minutos foi o que apresentou menor toxicidade durante o período de tratamento.

Nos resultados do plaqueamento dos testes de biodegradação realizados pelo sistema de respirometria observa-se que a carbamazepina mesmo sem tratamento (branco) apresenta uma variável tóxica ou ausência de subprodutos biodegradáveis (UV/H₂O₂) para os microrganismos. Pode-se observar que ocorre um decréscimo de 7 log no número de colônias viáveis nos primeiros 5 dias de tratamento para todas as situações. Após este período, o número de colônias apresenta um decréscimo lento até o décimo quinto dia de tratamento. Após este período não foi constatada a presença de colônias nos tratamentos branco, 5, 30, 45 e 60 minutos. Apenas o tratamento de 15 minutos apresentou a presença de colônias viáveis até o final do período experimental (28 dias).

Tabela 15 Contagem de microrganismos em UFC/mL dos ensaios de biodegradabilidade. Período de 27 dias. Tempo de reação em reator UV/H₂O₂ de 5 a 60 minutos. Carbamazepina/ H₂O₂ 10/26 ppm respectivamente. Branco composto puro.

Tempo em dias	0	5	8	12	15	19	21	27
Branco	2,17E-011	5,6E-04	0,27E-04	2,81E-04	1,37E-04	0	0	0
T5 min	2,17E-011	3,06E-04	0,23E-04	0,41E-04	2,81E-04	0	0	0
T15 min	2,17E-011	2,99E-04	0,26E-04	0,55E-04	0,42E-04	0,84E-04	2,16E-04	3E-04
T30 min	2,17E-011	1,67E-04	3,57E-04	0,66E-04	1,57E-04	0	0	0
T45 min	2,17E-011	3,04E-04	2,14E-04	1,56E-04	0,27E-04	0	0	0
T60 min	2,17E-011	3,57E-04	1,65E-04	0,43E-04	3E-04	0	0	0

5.9 Avaliação de DQO após ensaio de biodegradabilidade da carbamazepina em sistema fechado, baseado no Teste de Gledhill-modificado, 1988 (IBAMA).

As análises de DQO foram realizadas após os ensaios de respirometria com o intuito de acompanhar o processo de degradação da carbamazepina.

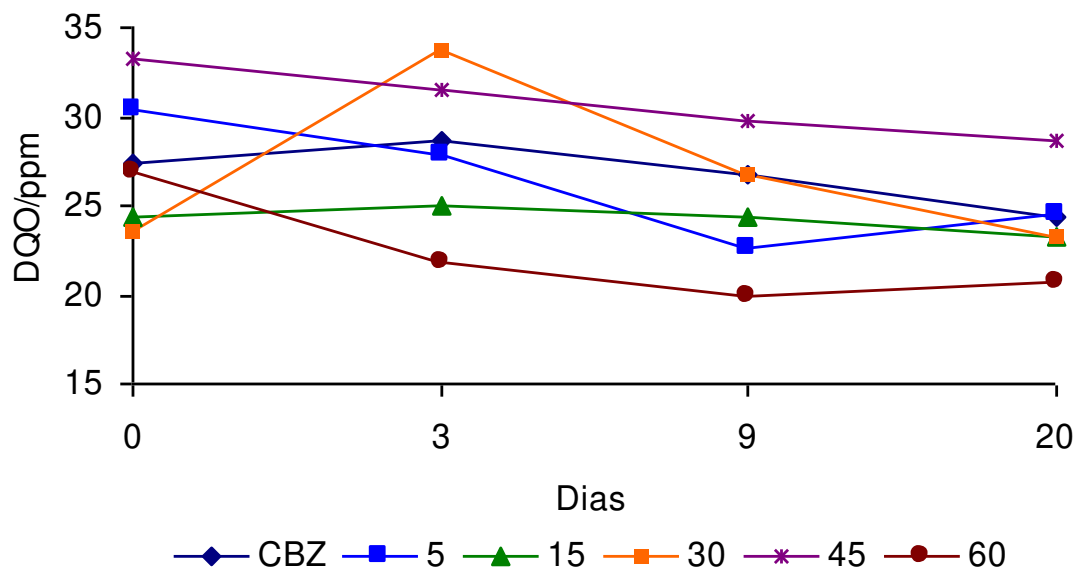


Figura 22 DQO do ensaio de respirometria feito a partir das amostras geradas no POA.

Na Figura 22 mostra-se que para todos os períodos testados de biodegradação da carbamazepina durante o processo de respirometria, ocorre uma redução da DQO até o nono dia de tratamento e que após este período esta redução não sofre alterações significativas até o período final de tratamento.

5.10 Toxicidade

5.10.1 Ensaios de Toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* (Crustacea, Cladocera), método ABNT NBR 13373

5.10.1.1 Ensaio 1 Análise da toxicidade da solução de trabalho de carbamazepina

A solução de estoque com concentração de 10ppm de carbamazepina pura não apresentou toxicidade para este microrganismo teste.

5.10.1.2. Ensaio 2 Análise da toxicidade do H₂O₂ residual das amostras

Nesse teste foi utilizada uma solução de carbamazepina na concentração de 10 ppm e 26 ppm de H₂O₂ após 60 minutos de tratamento em reator UV/H₂O₂. Após o período de tratamento amostras foram submetidas ao teste de toxicidade, e estas apresentaram resultados positivos para toxicidade aguda para *Ceriodaphnia dubia*, ocorrendo morte de todos os organismos-teste expostos em menos de 3 horas.

5.10.1.3 Ensaio 3 Análise da toxicidade das amostras geradas na respirometria feita após tratamento UV/H₂O₂

As amostras provenientes do ensaio de respirometria mostraram-se tóxicas a esses organismos-testes, em todos os tratamentos realizados. Foi observado que 100% dos organismos expostos apresentaram imobilidade durante as 48 horas da exposição.

5.10.2 Ensaio de Toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* método ABNT NBR 15411

5.10.2.1 Ensaio 1 Análise da toxicidade da solução de trabalho de carbamazepina

A solução de estoque com concentração de 10ppm de carbamazepina não apresentou toxicidade para os organismos testes (*Vibrio fischeri*).

5.10.2.2 Ensaio 2 Análise da toxicidade das amostras provenientes do reator UV/H₂O₂ nos diferentes tempos de detenção

Neste ensaio pode-se avaliar a toxicidade das amostras provenientes do reator de UV/H₂O₂ nos diferentes tempos de detenção. Foi verificado que o tempo de reação de 15 minutos apresentou uma menor toxicidade perante os demais tratamentos.

No tempo de detenção de 15 minutos o valor gama foi de 0,5153, no tempo de 5, 30 45 e 60 foram de 1,2943, 2,1020, 0,7863 e 0, 9592 respectivamente. No menor número de valor gama observa-se a menor toxicidade. A toxicidade foi expressa pelo valor gama, que corresponde à razão entre luz perdida e luz remanescente.

5.10.2.3 Ensaio 3 Análise de toxicidade das amostras geradas na respirometria feita após tratamento UV/H₂O₂

As análises de toxicidade foram realizadas a partir do ensaio de biodegradabilidade. Neste ensaio foi escolhido trabalhar com as amostras dos tempos de detenção de 15 e 60 minutos. Três datas foram escolhidas 22/07, 31/07 e 11/08, respectivamente as quais correspondem ao início, meio e final do teste de biodegradabilidade (Tabela 16).

Tabela 16 Ensaio de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* realizado após oxidação da carbamazepina por processo UV/H₂O₂ seguido por respirometria

Amostr a	Tempo de detenção	Leitura inicial	Leitura após 15 minutos	Valor Gama
22/07	15'	97	97	0,3278
		110	82	
22/07	60'	86	103	0,5101
		87	69	
31/07	15'	86	98	0,5491
		87	64	
31/07	60'	86	92	0,5011
		87	62	
11/08	15'	86	92	0,3687
		87	68	
11/08	60'	94	94	0,3710
		85	69	

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho foram similares aos encontrados na literatura, contudo a mesma não apresentava resultados adquiridos por ensaios de biodegradabilidade monitorados por plaqueamento e ensaios toxicológicos dos subprodutos provenientes do processo oxidativo empregado. A avaliação do desenvolvimento dos microrganismos durante o ensaio de biodegradação mostrou um decréscimo acentuado do número de microrganismos viáveis presentes tanto para o composto puro como também para os ensaios realizados após o tratamento com UV/H₂O₂.

Os resultados indicam que os microrganismos não foram capazes de utilizar o fármaco como fonte de carbono e energia mesmo após o tratamento UV/H₂O₂. Mesmo após quase um mês de ensaio de respirometria a quantidade do composto estudado permaneceu inalterada, afirmando assim os resultados da literatura estudada inerente ao seu grande potencial de acumulação ambiental.

A DQO se mostrou não muito recomendável dada à extensa margem de erro e a baixa concentração do composto usado no trabalho. Com o mesmo perfil gráfico o COT mostrou que a molécula era degradada, contudo o carbono não era eliminado da amostra, o que indicava a possível presença de grande quantidade dos subprodutos

gerados. Das técnicas utilizadas a cromatografia líquida de alta eficiência foi mais adequada para a avaliação da degradação do composto dentre as utilizadas.

A técnica de CCD foi eficaz no monitoramento da degradação da carbamazepina dentro do reator deste trabalho. A partir do momento que os resultados foram cruzados ficou evidente o destaque do tratamento de 15 minutos de reação dentro do reator. Este apresentou a menor toxicidade, com aparecimento de colônias até o período final de experimento 28 dias e mostrou a mais precoce resposta no teste de CCD, embora talvez o plaqueamento nesse tempo tenha sido estendido por suas culturas estarem se mantendo de subprodutos menos tóxicos ou de material celular disperso no meio.

Embora o produto farmacológico estudado não apresente toxicidade na concentração testada neste trabalho, foi observado que o mesmo não se aplica aos seus subprodutos aqui gerados. Os ensaios toxicológicos mostraram que os subprodutos da carbamazepina oriundos do POA apresentam efeitos tóxicos agudos para a *Ceriodaphnia dubia* e *Vibrio fischeri*. No caso da *Ceriodaphnia dubia*, que é comumente utilizada para ensaios crônicos, não foi possível o avaliar conforme a norma correspondente visto que esse microrganismo teste não conseguiu sequer passar pelo ensaio agudo.

Vale ressaltar que a concentração de peróxido residual permaneceu alta mesmo após uma hora de retenção da amostra dentro do reator utilizado. Com os resultados aqui obtidos pode-se avaliar pelos testes ecotoxicológicos, de certa maneira, a magnitude dos possíveis impactos que poderiam ser gerados no ambiente pelos subprodutos da oxidação incompleta desse composto farmacêutico, visto que afetam graus de níveis de base da cadeia alimentar.

7. CONCLUSÃO

- O composto se mostrou não biodegradável nos ensaios de lodo e solo, conforme citado anteriormente na literatura.
- Nas concentrações utilizadas foi possível observar a otimização do processo por CCD, onde se pode perceber o destaque do ensaio E3 no tempo de quinze minutos.
- O ensaio de carbono orgânico total mostrou um perfil gráfico constante entre os tempos de detenção, não havendo diferença significativa entre eles.
- O perfil da DQO mostrou-se constante como o carbono orgânico total.
- O processo oxidativo utilizado apresentou um bom desempenho para a dissociação dessa molécula, mesmo usando uma baixa concentração de peróxido de hidrogênio, quando analisado por cromatografia líquida de alta eficiência.
- A respirometria feita com as soluções dos diferentes tempos de detenção não foi eficaz na remoção da carbamazepina, a concentração permaneceu inalterada do começo ao final do ensaio, este foi monitorado por cromatografia de alta eficiência assim como a degradação do composto em reator de processo oxidativo avançado.
- A DQO feita a partir das soluções provenientes da respirometria apresentou leve queda em seus valores quando comparado o começo com o final deste ensaio.

- Embora a concentração utilizada para os experimentos desse trabalho não tenha se mostrado tóxica o mesmo não aconteceu com as soluções obtidas do reator.

Recomendações

Estudos devem ser realizados utilizando outros processos ou mesmo novas configurações de reatores oxidativos UV/H₂O₂ para modificar a estrutura dessa molécula, a fim de torná-la biodegradável.

Avaliação de outros processos oxidativos avançados para degradação do composto em estudo e de seus subprodutos.

Avaliar a biodegradação desta molécula por fungos, visto que estes foram contaminantes constantes nas nossas culturas de bactérias.

Método do IBAMA .1.13 tem necessidade de ser reavaliado, pois mostra-se de difícil reprodução.

8. REFERÊNCIAS

ABNT NBR 13373; Ecologia Aquática- Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Crustácea, Clarodela) , 2005.

ABNT NBR 15411-2 Ecotoxicologia aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (Ensaio de bactéria luminescente) Parte 2: Método utilizando bactérias desidratadas, 2006.

ADAMS, C. D., KUZHIKANNIL, J. J. Effects of UV/H₂O₂ pre-oxidation on the aerobic biodegradability of quaternary amine surfactants. **Water Research.**, v. 34, n. 2, p. 668-672, **2000**.

ANDREOZZI R.; MAROTTA R.; PAXUES N. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. **Chemosphere**, v.50, p.1319–1330; **2003**

ANDREOZZI R.; MAROTTA R.; PINTO G.; POLLIO A. Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity. **Water Research**, v.36, p.2869–2877. **2002**.

AWWA/APHA/WEF. STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. 21TH ED. WASHINGTON, DC: APHA, **2005**.

BEAUSSE, J. **Pharmaceuticals** - horizontal – 26 July **2004**

BELTRÁN, F.J.; OVEJERO, G.; ACEDO, B. Oxidation of atrazine in water by ultraviolet radiation combined with hydrogen peroxide. **Water Research.**, v.27, n.6, p. 1013-1021, **1993**.

BENITEZ, F.J.; HEREDIA, J.B.; ACERO, J.L.; GONZALEZ, T. Degradation of acid by two advanced oxidation processes: ozone/uv radiation and H₂O₂/ UV RADIATION. **Water Research.**, v.30, n.7, p. 1597-1604, **1996**.

BILA D. M.; DEZOTTI M. Fármacos no meio ambiente **Química Nova**, Vol. 26, No. 4, p. 523-530, **2003**

BRASIL. PORTARIA NORMATIVA IBAMA Nº 84, de 15 de outubro de 1996. Dispões sobre a caracterização de produtos perigosos. Disponível em: http://www.projetoselva.com.br/normas/portibama84_96.doc>. Acesso em: 01/03/2007

BUDAVARI, S. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., (ed.). **The Merck Index, Inc.**, p. 1691, **1996**.

CARUSO M.; HARVEY M.T.; ROBERTS C.; PATTERSON T.G.; KENNEDY C.H. Differential effects of carbamazepine on negatively versus positively reinforced responding. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**; 74, 221–227; **2002**

CHEMIDPLUS Lite. Base de dados. Disponível em: <<http://chem.sis.nlm.nih.gov/>> Acesso em: 20/08/2006

CLARA M.; STRENN B.; KREUZINGER N. Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of

Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. **Water Research** . v.38, p. 947–954; **2004**

CLASSIC,. In: Giddings, J.M. (Ed.), Community Level Aquatic System Studies— Interpretation Criteria. SETAC. 2002

COMCIENCIA. Matériade Vogt (2002). Disponível em:
<<http://www.comciencia.br/reportagens/epilepsia/ep05.htm>> Acesso em: 12/03/2008

CONSULTAREMEDIOS. Base de dados. Disponível em:
<www.consultaremedios.com> Acesso em: 12/03/2008

DAUGHTON C.G.; TERNES T.A.; Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? Environ. **Health Perspect.** 107, 907–938; **1999.**

DAUGHTON, C.G. Cradle-to-cradle stewardship of drugs for minimizing their environmental disposition while promoting human health. 1. Rationale for and avenues toward a green pharmacy. Environ. **Health Perspect.** V.111, p.757–774, **2003.**

DOMENECH, X., JARDIM, W. F., LITTER, M. I. PROCESOS AVANZADOS DE OXIDACION DE CONTAMINANTES. IN: ELIMINACION DE CONTAMINANTES POR FOTOCATALISES HETEROGENEA. LA PLATA, ARGENTINA: BLESÁ, CAP. 1, P. 3-25. 2001.

DOWNEY P., FAJURI A., VALDÉS G., Refractory arterial hypertension and the use of anticonvulsant drugs. Case report. **Rev. Méd. Chil.**, Nov; 129 (11), p. 1325-7, **2001.**

FENT K.; WESTON A.A.; CAMINADA D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v.76, p.122–159; **2006**

FERRARI B.; PAXEUS N.; GIUDICE R.; POLLIO A.; GARRIC J. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.55, p. 359–370; **2003**.

GHALY, M. Photochemical oxidation of p-chlorophenol by UV/H₂O₂ and photo-Fenton process. A comparative study. **Waste Management**, v. 21, p.41-47, **2001**.

GILMAN, A.G., T.W. RALL, A.S. NIES AND P. TAYLOR (eds.). **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 8th ed. New York, NY. **Pergamon Press**, p. 448, **1990**.

HALLING-SORENSEN B.; NIELSEN S.N.; LANZKY P.F.; INGERSLEV F.; LUTZHORFT H.C.; JORGENSEN S.E. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment. A review. **Chemosphere**, v.36, p.357–93; **1998**.

HEBERER T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. **Toxicol. Lett.** 131, p. 5–17; **2002**.

HEBERER T. Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. **J. of Hydrol**; 266(2–3):175–89; **2002**.

HUANG, C. P.; DONG C.; TANG, Z. Advanced chemical oxidation: Its present role and potential future in hazardous waste treatment. **Waste Management**, v. 13, p. 361-377, **1993**.

IBAMA Instituto brasileiro do meio ambiente e recursos naturais renováveis. Teste da biodegradabilidade imediata pela medida do dióxido de carbono desprendido em sistema fechado. Ensaio E.1.1.3, **1988**.

JARDIM, W. J.; MORAES, S. G.; TAKIYAMA, M. M. K. Photocatalytic degradation of aromatic chlorinated compounds using TiO₂: toxicity of intermediates. **Water Research.**, v. 31, n. 7, p. 1728-1732, **1997**.

JONES A.H.; VOULVOULIS N.; LESTER J.N.; Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. **Water Research.** v. 36, p.5013–5022; **2002**.

JONES O.A.H.; VOULVOULIS N., LESTER J.N. Human pharmaceuticals in the aquatic environment—a review. **Environ. Technol.**, V.22, 1383–1394; **2001**.

JORGENSEN S.E.; HALLING-SORENSEN B. Editorial: drugs in the environment. **Chemosphere** 40, 691–699; **2000**.

KUBOVA H.; MARES P. Anticonvulsant action of oxcarbazepine, hydroxycarbamazepine, and carbamazepine against metrazol-induced motor seizures in developing rats. **Epilepsia**; v.34, p. 188–92; **1993**.

LEGRINI, O.; OLIVEROS, E.; BRAUN, M. Photochemical processes for water treatment. **CHEM. Rev.**, v. 93, p. 671-698, **1993**.

MARCO, A.; ESPLUGAS, S.; SAUM, G. How and why to combine chemical and biological processes for wastewater treatment. **Wat. Sci. Technol.**, v. 35, n. 4, p. 321-327, **1997**.

MATALON,S.; SCHECHTMAN, S; GOLDZWEIG, G, ET AL.The teratogenic effect of carbamazepine: a meta-analysis of 1255 exposures. **REPRODUCTIVE TOXICOLOGY**. v. 16 , p 9-17, **2002**.

MERCK ídex. Base de Dados. Disponível em: <www.merck-chemicals.com> consultado em 04/05/2007.

MEYER J.G. TERATOGENIC RISK OF ANTICONVULSIVANTS AND THE EFFECTS ON PREGNANCY AND BIRTH. **EUR NEUROL**. V.10, P. 17990, **1979**.

OLLERS S.; SINGER H.P.; FASSLER, P.; MULLER S.R. Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water. **J. Chromatogr**. v. A 911, p.225–234, **2001**.

PANTAROTTO C ET AL; Anal Biochem 93 (1): 115 (1979) consultado em www.toxinet.nlm.nih.gov.

SACHER F.; LOCHOW E.; BETHMANN D.; BRAUCH H.J. Occurrence of pharmaceutical active compounds in surface waters (Vorkommen von Arzneimittelwirkstoffen in Oberfl.achenw.assern). In: **Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker**, editors. Vom Wasser. vol. 90.Weinheim: Wiley—VCH Verlags GmbH; p. 233–43; **1998**.

SANDERSON H.; JOHNSON D.; REITSMA J.; BRAIN R.A.; WILSON C.J.; SOLOMON K.R. Ranking and prioritization of environmental risks of pharmaceuticals in surface waters. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** , v.39, p.158–183; **2004**.

SANDERSON H.; JOHNSON D.; WILSON C.; BRAIN, R.; SOLOMON K.R. Probabilistic hazard ASSESSMENT of environmentally ccurring pharmaceuticals

acute toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening. **Toxicol. Lett.**, v.144, p.383–395; **2003**.

SATTELBERGER R. Residues of Pharmaceutical substances in the environment (Arzneimittelrückstände in der Umwelt— Bestandsaufnahme und Problemdarstellung), Report R- 162. Wien: Umweltbundesamt GmbH; (ISBN 3-85457- 510-6); **1999**.

SEILER R.L.; ZAUGG S.D.; THOMAS J.M.; HOWCROFT D.L. Caffeine and pharmaceuticals as indicators of waste water contamination in wells. **Ground Water** 37 (3), p. 405–410; **1999**.

SILVA, C.M.; ROQUE M.R.; MELO I.S. Microbiologia Ambiental: Manual de Laboratório. 1^aed. Jaguariúna. **2000**.

SWANN R.L.; LASKOWSKI D.A.; MCCALL P.J. A rapid method for the estimation of the environmental parameters octanol/water partition coefficient, soil sorption constant, water to air ratio and water solubility. **Res Rev** 85: 17-28, **1983**.

TERNES T. OCCURRENCE of pharmaceuticals in surface waters (Vorkommen von Pharmaka in Gewässern). **Wasser and Boden**; 53(4):9–14; **2001**.

TERNES T.A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. **Water Research.**, v.32, p.3245–3260; **1998**.

TERNES T.A.; STUBER J.; HERRMANN N.; MCDOWELL D.; RIED A.; KAMPMANN M.; TEISER B. Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater? **Water Research**; 37(8):1976–82; **2003**.

THAKER. PHARMACEUTICAL data elude researchers. **Environ. Sci. Technol.** 139 (9), 193A–194A; **2005**.

TIXIER C.; HEINZ P. SINGER S.; OLLERS J.; MULLER S. Occurrence and Fate of Carbamazepine, Clofibric Acid, Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen, and Naproxen in Surface Waters , **ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY**, VOL. 37, NO. 6, / 9, p. 1061-1068, **2003**.

TOXNET. Base de dados . Disponível em :
<www.toxinet.nlm.nih.gov >. Acesso em: 20/08/2006

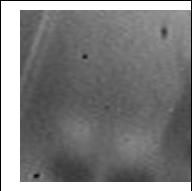
U.S. PHARMACOPHEIA. The United States Pharmacopeia, USP 29/The National Formulary, NF 22; Rockville, MD: U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., p.369,**2006**.

USEPA. Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms, 2nd Edition. EPA 600/4-89-001. Environmental Monitoring Systems Laboratory, Cincinnati, OH. **1989**.

USEPA. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents Receiving waters to Freshwater and Marine Organisms, 4th Edition. EPA/600/4-90/027. **1991**.

VAN ROOYEN G.F.; BADENHORST D.; SWART K.J.; HUNDT H.K.L.; SCANES T.; HUNDT A.F. Determination of Carbamazepine and Carbamazepine 10,11-epoxide in human plasma by tandem liquid chromatography–mass spectrometry with electrospray ionisation. **J. of Chromatography B: Anal Technol Biomedical and Life Sciences**; 769(1):1–7; **2002**.

VOGNA D.; MAROTTA R.; ANDREOZZI R.; NAPOLITANO A.; D'ISCHIA M. Kinetic and chemical assessment of the UV/H₂O₂ treatment of antiepileptic drug carbamazepina. **Chemosphere**; v.54, p. 497–505; **2004**.



VREE, T. B.; VAN DER VEN, A. J. A. M.; Van Ewijk-Beneken Kolmer, E. W. J.; Swolfs, A. E. M.; Van Galen, P. M.; Anatdjais-Groenen, H.; **J. Chromatography**, *B*, 658, 327. **1994**.

WEBB W.; TERNES T.; GIBERT M.; OLEJNICZAK K. Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water. **Toxicol Lett**; 142(3):157–67; **2003**.

WIKIPÉDIA. Desenvolvido pela Wikimedia Foundation. Apresenta conteúdo enciclopédico. Disponível em:

<http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Per%C3%B3xido_de_hidrog%C3%AAnio&oldid=12361670>. Acesso em: 22 Set 2008

ZUCCATO E.; CALAMARI D.; NATANGELO M.; FANELLI R. Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet* 355, 1789–1790; **2000**.

ZUCCATO E.; CASTIGLIONI S.; FANELLI R. Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**. 122, 205–209; **2005**.